

UNIVERSITE DE LYON
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
Année 1965 — N° 521

**Contribution à l'étude botanique
chimique et pharmacologique
de
Baptisia australis (L) R. Br**

THESE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon

Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté Mixte de
Médecine et de Pharmacie de LYON

le 30 Juin 1965

par

OUNG-BORAN

né le 4 Octobre 1933 à SUONG (Cambodge)



Imprimerie Générale Lyonnaise
32, cours Gambetta, 32 - LYON

1965

Contribution à l'étude botanique
chimique et pharmacologique
de
Baptisia australis (L) R. Br

UNIVERSITE DE LYON
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
Année 1965 — N° 521

Contribution à l'étude botanique
chimique et pharmacologique
de
Baptisia australis (L) R. Br

THESE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon

Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté Mixte de
Médecine et de Pharmacie de LYON

le 30 Juin 1965

par

OUNG-BORAN

né le 4 Octobre 1933 à SUONG (Cambodge)



Imprimerie Générale Lyonnaise
32, cours Gambetta, 32 - LYON

1965

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen Honoraire	M. J. LEPINE Membre de l'Institut
Doyen Honoraire	M. H. HERMANN, Correspondant de l'Institut
Doyen	M. J.-F. CIER
Assesseur	M. M. LEVRAT
Assesseur	M. L. REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. PATEL, LEIPNE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET, POLLOSSON.

PROFESSEURS

Clinique Urologique	MM. CIBERT
Physique Biologique	PONTHUS (détaché à Beyrouth)
Clinique neuro-psychiatrique et hygiène mentale	DECHAUME
Chimie organique et toxicologie	CHAMBON
Clinique chirurgicale B	WERTHEIMER
Clinique médicale B	PAUPERT-RAVAULT
Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires	FROMENT
Clinique médicale C	CROIZAT
Chimie biologique et médicale	ENSELME
Clinique chirurgicale A	MALLET-GUY
Pharmacie galénique	REVOL
Clinique obstétricale	PIGEAUD
Médecine du travail	BOURRET
Clinique médicale A	LEVRAT
Hygiène et action sanitaire et sociale	SOHIER
Botanique et cryptogamie	NETIEN
Clinique chirurgicale C	BERTRAND
Chimie analytique pharmaceutique	BADINAND
Pharmacie chimique et pharmacologie	DREVON
Médecine légale et déontologie	ROCHE
Parasitologie et pathologie exotique	COUDERT
Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie	MOUNIER-KUHN
Clinique ophtalmologique	PAUFIQUE
Clinique de dermatologie, syphillographie et allergologie	THIERS
Clinique de pneumo-phthisiologie	BRUN
Clinique traumatologique des membres	CREYSSEL
Clinique carcinologique	DARGENT
Anatomie pathologique	GUICHARD
Pathologie générale et expérimentale	GIRARD Paul
Anatomie	LATARIET
Pathologie chirurgicale	PEYCELON
Clinique médicale D	GIRARD Marcel
Pathologie médicale	VACHON
Physio-Pathologie des voies respiratoires	GALY
Radiologie	PAPILLON
Clinique médicale Infantile et hygiène du premier âge	JEUNE
Thérapeutique	GONIN
Bactériologie	MONNET
Physiologie et pathologie obstétricales	BANSILLON
Physiologie B	CHATONNET
Clinique endocrinologique	GUINET
Clinique de chirurgie orthopédique	TRILLAT
Clinique stomatologique	FREIDEL
Clinique de chirurgie et d'orthopédie Infantiles	MARION Joseph
Matière médicale et législation pharmaceutique	DORCHE
Histologie et embryologie	DUMONT Louis
Chimie	PERROT
Physiologie	CIER J.-F.
Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire	PERRIN J.
Clinique de Chirurgie Cardiaque	MICHAUD Pierre
Clinique médicale infantile	SARROUY Charles
Clinique gynécologique	MATHIEU
Biologie médicale et pharmacodynamie	FAUCON
Clinique des maladies infectieuses	X....
Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale	X....

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appliquée à la médecine	MM. BERGER
Bactériologie	BERTOYE
Neuro-chirurgie	MENSUY
Chimie générale pharmaceutique	COLLET
Hygiène et Climatologie	LACROIX
Clinique chirurgicale propédeutique	LIARAS
Neuro-chirurgie	LECUIRE
Médecine générale	REVOL
Thérapeutique chirurgicale	GOINARD
Pharmacie chimique et Pharmacologie	CIER André
Médecine générale	PONT Maurice
Médecine générale	TRAEGER

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Parasitologie	MM. ROMAN
Anatomie pathologique	FEROLDI
Physique biologique	MORET
Botanique et cryptogamie	ODDOUX
Chimie analytique	de SOLLIERS
Médecine générale	DESPIERRE
Parasitologie	GARIN
Médecine du Travail	TOLOT

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Chimie biologique	MM. GREYSSER Roger
Hygiène	THIVOLET
Electro-Radiologie	PINET
Neuro-psychiatrie	GUYOTAT
Chirurgie générale	DESCOTES
Pathologie expérimentale	JOUVET
Physique biologique	PEYRIN
Anatomie pathologique	TOMMASI
Electro-radiologie	BUFFARD
Médecine générale et thérapeutique	LEJEUNE
Stomatologie	de MOURGUES François
Maladies infectieuses	NAUSSAC
Chirurgie générale	REBOUILLAT
Pédiatrie	ROMAGNY
Médecine générale	DELAHAYE J.-P.
Anesthésiologie	DELEUZE R.
Electroradiologie diagnostic et thérapeutique	GIRAUD M.
Anesthésiologie	MICHEL
Pédiatrie et puériculture	FRANCOIS
Chirurgie générale	MICHOULIER
Dermatologie	COLOMB
Médecine générale	LAMBERT
Médecine générale	FRIES
Pédiatrie	GILLY
Médecine générale	ROBERT
Anatomie	BOUCHET
Pédiatrie	BETHENOD
Immunologie, sérologie, hématologie	GERMAIN
Pneumo-phthisiologie	KALB
Pédiatrie	LARBRE
Chirurgie générale	SOUSTELLE
Chirurgie générale	VIALA
Bactériologie, parasitologie, virologie	VINCENT
Médecine légale	COLIN

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

Hématologie	FAVRE-GILLY
Histologie et embryologie	GIROD
Chimie biologique	GRAS
Chimie analytique	MALLEIN
Hygiène	RIFFAT
Physiologie	FLANDROIS
Bactériologie	VIALIER-RAYNARD
Pharmacie galénique	ROLLET

AGREGES EN EXERCICE

Ophtalmologie	BONAMOUR
Chirurgie générale	de MOURGUES Georges
Médecine générale	DEVIC
Obstétrique	DUMONT Martial
Urologie	DURAND
Chirurgie générale	FRANCILLON
Chirurgie générale	SAUBIER
Neuro-Psychiatrie	SCHOTT
Neuro-chirurgie	ALLEGRE
Electro-Radiologie	CHASSARD
Orthopédie	FAYSSÉ
Oto-rhino-laryngologie	GAILLARD
Médecine générale	GARDE
Ophtalmologie	HUGONNIER
Chirurgie générale	MARET
Médecine générale	MORNEX
Médecine générale	NORMAND
Médecine générale	PERRIN André
Stomatologie	DUMAS
Obstétrique	GARMIER
Médecine générale	NOEL
Orthopédie	SCHNEPP
Médecine générale	MOUNIER-KUHN

EXAMINATEURS DE LA THESE :

Monsieur le Professeur G. NETIEN
Monsieur le Professeur J. DORCHE
Monsieur le Professeur A. CIER
Monsieur le Professeur L. ODDOUX
Monsieur le Professeur Agrégé J. LACHARME

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

En témoignage de ma profonde reconnaissance.

Puisse ce travail lui procurer une consolation
à ma très longue absence.

A MA FEMME

Compagne toujours agréable et dévouée.
Je l'assure de tout mon amour.

A MES ENFANTS
CHRISTOPHE - SARA
SOPHIE

Avec tout mon amour paternel

A MA SŒUR

A MES FRERES

A MA GRAND'MERE : MADAME CAVALIER

A MES BEAUX-PARENTS

A MA BELLE-SŒUR

Avec toute mon affection

A TOUS MES AMIS

En gage de mes sincères amitiés.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur G. NETIEN

Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui nous fait le grand honneur de diriger
nos travaux et de présider le jury de cette
thèse.

Témoignage de profonde gratitude et
respectueuse reconnaissance.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY

Monsieur le Professeur J. DORCHE

Qui a accepté de juger ce travail.
Témoignage de respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur A. CIER

Chevalier de la Légion d'Honneur

Il nous a fait un grand honneur et un immense plaisir de juger ce travail.

Nous ne saurions assez lui exprimer notre respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur L. ODDOUX

Nous lui sommes reconnaissant du grand intérêt qu'il n'a cessé de nous témoigner au cours de notre passage au laboratoire.

Nous le remercions de bien vouloir être juge et nous lui exprimons notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur agrégé J. LACHARME

Maitre de conférences à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Grenoble

Il nous a fait profiter de ses connaissances scientifiques pour l'élaboration de notre travail.

Nous lui en sommes profondément reconnaissant et nous sommes heureux de le compter parmi nos juges.

PLAN DE TRAVAIL

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : ETUDE BOTANIQUE

Travaux antérieurs

Chapitre I : Le genre Baptisia

Chapitre II : Les différentes espèces de Baptisia et leur description

Travaux personnels

Chapitre I : Etude morphologique

Chapitre II : Etude anatomique

DEUXIEME PARTIE : ETUDE CHIMIQUE

Travaux antérieurs

Travaux personnels

Chapitre I : Essais préliminaires

1 — Techniques utilisées

2 — Résultats

Chapitre II : Substances azotées

I. - Etude des alcaloïdes

1 — Travaux antérieurs sur les alcaloïdes

2 — Travaux personnels

A - Extraction

B - Etude des alcaloïdes extraits

a - Etude qualitative des alcaloïdes

b - Dosage

c - Etude de P2

C - Conclusion

II. - Les acides aminés

Chapitre III : Les substances polyphénoliques

1 — Etude de dérivés flavoniques dans les feuilles

2 — Etude de deux dérivés de type isoflavonique dans les racines.

TROISIEME PARTIE : ETUDE PHARMACOLOGIQUE

Travaux antérieurs

Travaux personnels

1 — Toxicité aiguë chez la souris

2 — Action sur le duodénum isolé du cobaye

3 — Action sur l'oreillette isolée du cobaye.

4 — Effets cardiovasculaires, in vivo, chez le lapin.

CONCLUSIONS GENERALES

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Le **Baptisia tinctoria** R. Br est connu sous le nom d'indigo sauvage. C'est une plante tinctoriale de la famille des Légumineuses originaire d'Amérique du Nord et très fréquente dans les bois sablonneux des Etats-Unis.

Cette plante a fait l'objet d'une étude homéopathique et c'est dans New Remedies de HALLE que la pathogénésie a été instituée en utilisant la teinture de racine sèche. Elle est inscrite dans la Pharmacopée homéopathique américaine, allemande et française (14).

Les principales indications homéopathiques (35) sont : les états fébriles graves, les altérations profondes de l'organisme dues à l'infection digestive à prédominance intestinale, la prostration extrêmement marquée et la fétidité de tous les excréats.

Dans l'Encyclopédie médico-chirurgicale, (59) le volume consacré à l'homéopathie en fait un remède pour la typhoïde. « En réalité il n'est pas le remède de la typhoïde mais celui des infections intestinales de formes typhiques, qu'elles soient à bacille d'Eberth, à bacille para A, para B ou non. Le premier stade de la typhoïde se trouve raccourci dans la pathogénésie de **Baptisia**, et c'est la période d'état qui correspond aux grands caractères du remède. Les antibiotiques sont, bien entendu, à mettre en jeu. Baptisia peut leur être utilement adjoint si les caractéristiques sont nettes ».

Dans la pratique homéopathique on importe les racines sèches d'Amérique du Nord pour préparer la teinture mère et celle-ci utilisée souvent à basse dilution constitue un médicament réputé et d'usage courant. Les difficultés d'importation du matériel végétal utilisé en homéopathie de provenance diverse (Amérique du Nord, Amérique équatoriale, Afrique, Indes) font que les pharmaciens homéopathes français ont intérêt dans certains cas à essayer de se procurer la drogue sur place. C'est ainsi que, dans le genre **Baptisia**, plusieurs espèces d'Amérique du Nord peuvent être cultivées sous nos climats ; nous avons pensé que ce problème pourrait retenir notre attention.

Il existe en horticulture française une espèce ornementale **Baptisia australis** R. Br cultivée pour ses magnifiques fleurs bleues, et très rigoureuse. Nous avons pensé que cette espèce pourrait à la rigueur être substituée à **Baptisia tinctoria** R. Br et avons cherché à présenter un travail dans lequel on retrouverait une analogie chimique et pharmacologique entre ces 2 espèces.

Tel est l'objet de ce travail réalisé sur **Baptisia australis** R. Br, travail qui s'appuie sur les données antérieures réalisées sur **Baptisia tinctoria** R. Br.

Avant d'aborder l'exposé de ce travail, qu'il me soit permis d'exprimer à mon Maître le Professeur G. NETIEN, qui m'a accueilli au Laboratoire de Botanique et de Crytogamie de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon, ma très vive reconnaissance. Attiré chez lui par la chimie végétale, j'ai découvert au cours de mon séjour au laboratoire un Maître doué d'une capacité énorme de travail et d'un esprit critique rigoureux. Malgré ses occupations écrasantes, il ne s'est jamais ménagé pour me guider dans mon travail.

J'exprime également mes très respectueux remerciements à Monsieur le Professeur DORCHE qui a bien voulu juger ce travail.

A Monsieur le Professeur A. CIER, qui a bien voulu me permettre de réaliser dans son laboratoire quelques essais pharmacologiques, j'adresse ma très vive reconnaissance.

Monsieur le Professeur L. ODDOUX m'a toujours accueilli avec une grande bienveillance et a bien voulu m'accorder son appui efficace. Qu'il veuille accepter ma très vive gratitude.

Monsieur J. LACHARME, Maître de Conférences agrégé, est pour nous tous au laboratoire un élément précieux pour la recherche. Ses grandes connaissances scientifiques m'ont constamment aidé et sa sollicitude s'est étendue au delà du cadre de la thèse. En quittant le laboratoire, je quitte un homme dont j'ai pu apprécier non seulement les qualités scientifiques mais aussi les qualités humaines. Qu'il trouve ici l'expression de mes respectueux remerciements.

Je tiens à associer dans ma gratitude tous ceux qui m'ont facilité la tâche :

— Monsieur Ph. LEBRETON, maître de conférences au laboratoire de Botanique et de Mycologie de la Faculté de Sciences de

Lyon pour l'exécution et l'interprétation des différents spectres ultraviolets et infrarouges des substances polyphénoliques.

— Le laboratoire du Docteur PLANTIER et en particulier Madame LANDRIVON pour des essais pharmacologiques.

Je ne saurais oublier tout le personnel du laboratoire qui, de près ou de loin, a participé à l'élaboration de la thèse et auprès duquel j'ai toujours trouvé un dévouement désintéressé. Qu'il veuille accepter mon infinie reconnaissance et ma sincère amitié.

Enfin qu'il me soit permis d'exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Médecin Général BORON, Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire et de l'Hôpital Militaire d'Instructions Desgenettes qui m'a toujours témoigné sa sympathie au cours de mon séjour à l'Ecole et à tous mes anciens camarades de la « boîte » mes sincères amitiés.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BOTANIQUE

TRAVAUX ANTERIEURS

I. — LE GENRE BAPTISIA

Dans le *Journal de VALENTINAT* créé en 1894, le genre *Baptisia* (de baptême) se trouve réuni aux autres espèces indiennes et de quelques espèces, pour les légumineuses d'Amérique boréale.

DE CANDOLLE (11) et SPACH (12) classèrent ce genre dans la tribu des *SOPIROIDES* avec le genre *Myrospermum* Jacq. — *Sophora* Linn. — *Edwardia* Salisb. — *Ormosia* Jacke. — *Virgilia* Lamx. — *Macroptis* Des. — *Anagyris* Linn. — *Thermopsis* R. Br. — *Delania* Desv. — *Cyclops* Vent. — *Podalyria* Lamx. — *Chorizema* Labill. — *Podolobium* R. Br. — *Oxylobium* Andr. — *Callistachys* Vent. — *Brachysema* R. Br. — *Gompholobium* Smx. — *Burtonia* R. Br. — *Jacksonia* R. Br. — *Viminaria* Smx. — *Sphaerolobium* Smx. — *Antus* Smx. — *Xeropetalum* R. Br. — *Dillwynia* Smx. — *Eutaxia* R. Br. — *Sclerothamnus* R. Br. — *Gastrolobium* R. Br. — *Euchilus* R. Br. — *Pultenaea* Smx. — *Daviesia* Smx. — *Mirbelia* Smx.

Description de la tribu des PODALYRIEES

D'après H. BALLON (3), les *Podalys* ont les fleurs hermaphrodites et irrégulières, résuscitées. Leur réceptacle a la forme d'une coupe élargie d'avant en arrière et ornée d'un rebord glanduleux. Au fond de la coupe s'insère le gynécée et les autres organes floraux sont portés sur les bords. Le calice est gamopétalé. Il a la forme d'un sac épais, partagé supérieurement en 5 dents ou lobes égaux ou légèrement inégaux, valvaires en général dans la préfloraison. Les pétales forment une corolle papilionacée, à préfloraison vexillaire, ils ont un onglet étroit, le limbe de l'étendard est large, presque orbiculaire, souvent émarginé, les ailes sont un peu plus courtes, irrégulièrement et obliquement ovales, la

carène est incurvée, obovée, obtuse au sommet, plus courte que les ailes. Le gynécée se compose d'un ovaire, sessile ou à peu près, presque central, surmonté d'un style dont l'extrémité se dilate en une petite tête stigmatifère. Dans l'ovaire on observe un nombre indéfini d'ovules, disposés sur deux rangées verticales, incomplètement anatropes, obliquement descendants, avec le micropyle dirigé en haut et en dehors. Le fruit est une gousse, presque globuleuse, ou ovoïde, ou oblongue, turgide, à péricarpe bivalve, coriace ; elle renferme un nombre variable de graines, incomplètement campylotropes, souvent ascendantes, avec le micropyle dirigé en bas et en dehors. Au niveau du hile, le funicule se dilate en un petit arille charnu.

Les podalyres sont des arbustes de l'Afrique australe ; on en compte une quinzaine d'espèces. Presque tous les organes sont chargés de duvet. Les feuilles sont alternes, simples, pétiolées, accompagnées de deux stipules latérales, subulées, souvent caduques. Les fleurs sont pédonculées, placées dans l'aisselle des feuilles, ordinairement solitaires ou géminées, plus rarement en nombre plus considérable.

Les podalyres sont au nombre de 26 genres. Deux d'entre eux habitent l'Afrique australe et ne renferment que des arbustes : ce sont les **Podalaria** et les **Cyclopia**.

Cinq sont originaires de l'hémisphère boréale et ont des feuilles herbacées : ce sont les **Baptisia**, **Thermopsis**, **Anagyris**, **Pithanthus** et **Pickeringia**.

Les autres genres sont australiens, souvent formés de petits arbustes à feuilles coriaces, persistantes. On en compte dix-neuf : **Brachysema**, **Jansonia**, **Oxylobium**, **Chorizema**, **Isotropis**, **Gompholobium**, **Mirbelia**, **Burtonia**, **Jacksonia**, **Sphoerolobium**, **Viminaria**, **Daviesia**, **Aothus**, **Phyllota**, **Castrolobium**, **Pultenoea**, **Eutaxia**, **Dillwynia**, **Latrobea**.

Différenciation entre les PODALYRIEES et les SOPHOREES

Les SOPHOREES sont représentées par des arbustes habitant les régions chaudes du monde entier, et se distinguent de la tribu des PODALYRIEES par :

— Les fleurs avec la carène oblongue, presque droite ; les deux pétales qui la forment sont unis, ou se recouvrent l'un l'autre par leur bord inférieur.

— Les fruits sont des gousses moniliformes, arrondies ou légèrement comprimées, coriaces ou ligneuses ou même charnues, quelquefois tardivement déhiscentes en deux valves.

— Les feuilles sont alternes, imparipennées, à folioles en nombre indéfini ou peu considérable, accompagnées ou non de stipules sétacées.

Description du genre BAPTISIA

Le genre **Baptisia** est représenté par des herbes vivaces.

Les feuilles sont trifoliées ou rarement simples. Elles sont accompagnées de deux stipules latérales.

Les fleurs sont hermaphrodites. Le calice est bilabié, à quatre ou cinq dents inégales. La lèvre supérieure est entière ou fendue à deux lobes ; la lèvre inférieure est profondément trilobée. L'étendard est réniforme ou presque circulaire. Les ailes et la carène sont presque égales, droites, oblonques. Les étamines sont distinctes et caduques ; l'ovaire stipité, polysperme.

Le fruit : ce sont des gousses de texture ligneuse ou coriace, globuleuses, assez renflées, cylindriques, se terminant par un bec recourbé.

II. — LES DIFFERENTES ESPECES DE BAPTISIA

Le genre **Baptisia** Vent. renferme d'après l'index Kewensis et ses suppléments actuellement parus les espèces suivantes.

- **Baptisia alba** R. Br in Ait. Hort. Kew ed. II. iii. 6. - Am bor.
- **Baptisia albiflora** Rafin. New Fl. Am. ii. 47. - Am. bor.
- **Baptisia albescens** Small, Fl. S. E. US. 600 - Am bor.
- **Baptisia arachnifera** W H. Ducan in Rhodora, XIVi. 29 (1944) U. S. A. (Georgia).
- **Baptisia auriculata** Sweet, Hort. Brit. ed. II. 123 - Am. bor.
- **Baptisia australis** R. Br. in Ait. Hort. Kew. ed II. iii. 6 - Am. bor.
- **Baptisia bushü** Small, 1. c. 600 - Am. bor.

- **Baptisia calycosa** Engelm. in Coult. Bot. Gaz. iii (1878) Florida.
- **Baptisia cinerea** (Raffin) Fernald et Shubert in Rhodora 1 201 (1948) : *Lasinia cinerea*.
- **Baptisia cuneata** Small, in Bull Torr Bot. Club 1898 - 139 - Am. bor.
- **Baptisia elleptica** Small ; L ; c. 599 - Am. bor.
- **Baptisia gibbesii** Small, l. c. - Am. bor.
- **Baptisia hugeri** Small, l. c. - Am. bor.
- **Baptisia hirsuta** Small, l. c. 598 - Am. bor
- **Baptisia lanceolata** Ell. Sketch, i. 467 - Am. bor.
- **Baptisia lecontii** Torr et Gray, Fl. N. Am. i. 386 - Florida.
- **Baptisia leucantha** Torr et Gray, l. c. 385 - Am. bor.
- **Baptisia leucophea** Nutt. Gen. Am. i. 282 - Am. bor.
- **Baptisia laevicaulis** Small, l. c. 134. - Am. bor.
- **Baptisia lupinoides** Burbidge, in Gard. chron. (1884) i. 827 - Am. bor.
- **Baptisia macilenta** Small ex Larisey. L ; c. 165 U. S. A. Louisiana.
- **Baptisia megacarpa** Chapm. Ex Torr et Gray Fl. N ; Am. i. 386 Florida.
- **Baptisia microphylla** Nutt. in Jour. Acad. Philad. vii (1834) 97 - Florida.
- **Baptisia nukulifera** Greene, Leaflets Bot. Obs. ii 84 (1910) Am. bor.
- **Baptisia nuttaliana** Small, l. c. 599 - Am. bor.
- **Baptisa oxyphylla** Greene l. c. 83 - Am. bor.
- **Baptisia pendula** Larisey, l. c. 170 U. S. A. (S. Carolina-Georgia-Florida).
- **Baptisia perfoliata** R. Br. in Ait. Hort Kew. ed. II. iii 5 Am. bor.

- **Baptisia psammophila** Larisey, l. c. 180 U. S. A. (Georgia-Florida).
- **Baptisia retusa** Rafin. New Fl. Am. ii. 47 - Am. bor.
- **Baptisia riparia** Larisey, l. c. 192 USA - Florida.
- **Baptisia saligna** Greene, l. c. 84 - Am. bor.
- **Baptisia Serenae** M. Curt, in Am. Journ. Sc. Ser. II. vii (1849) 406 - Am. bor.
- **Baptisia simplicifolia** Croom, in Am. Journ. Sc. xxv (1834) 74 - Florida.
- **Baptisia sphaerocarpa** Nutt. in Journ Acad. Philad. vii (1834) 97 - Texas.
- **Baptisia sulphurea** Engelm. in Coult. Bot Gaz iii. (1878) 65 - Am. bor.
- **Baptisia tinctoria** R. Br in Ait Hort Kew ed II iii 6 - Am. bor.
- **Baptisia versicolor** Rafin New Fl. Am. iv. 107 ; nomen - Am. bor.
- **Baptisia vespertina** Small ex Rydb. Fl. Prairies et Plains. Centre N. Am. 456 (1932) USA (Central States).
- **Baptisia villosa** Nutt. Gem. Am. i 281 - Carolina.
- **Baptisia viridis** Larisey, l. c. 196 USA. - (Oklahoma - Texas - Missouri - Arkansas - Louisiana).

SYNONYMES ENTRE CERTAINES ESPECES

- I) — **Baptisia alba** Hook. Bot. t. ii 77 = leucantha.
- II) — **Baptisia barcteata** Muhl. Ex Ell. Sketch, i. 469 = leucophea.
- III) — **Baptisia caerulea** Eaton et Wright, Ma. n. Am. Bot. 194 = australis.
- **Baptisia confusa** Sweet, ex G. Don, Gen. Syst. ii 113 = australis.
- **Baptisia exaltata** Sweet, Birt, Flow. Gard. l. t. 97 = australis.
- **Baptisia texana** Buckl. in Proc. Acad. Philad. (1861-1862) 452 = australis.

— **Baptisia versicolor** Lodd. Bot. Cab. t. 1144 = australis.

— **Baptisia minor** Lehm. in nov. Act. Cur. xiv (1829) 803 = australis.

IV) — **Baptisia stipulacea** Ravenel, in Elliot Soc. Nat. Hist i (1856) t. 2 = microphylla.

DESCRIPTION DES ESPECES

Il existe une trentaine d'espèces dans l'est et le sud des USA ; voici quelques espèces les plus fréquentes, signalées dans la flore de GLEASON (17).

1) **BAPTISIA CINEREA** (Raf) Fern. et Schub. Plantes de 3 à 6 dm de hauteur, ramifiées, plus ou moins pubescentes avec quelques branches pendantes.

Les stipules sont lancéolées, celles des feuilles inférieures sont habituellement persistantes.

Pétioles très gros de 3 à 6 mm de long.

Les folioles sont coriaces, elliptiques à oblongues de 4 à 8 cm de long.

Les fleurs sont jaunes de 20 à 28 mm de long.

Les gousses elliptiques de 5 cm de long sont portées par des pédoncules de 10 mm de long et terminées par un bec effilé.

Croissent sur le sol sec et sablonneux des plaines côtières.

2) **BAPTISIA VIRIDIS** Larisey. Plantes de 1 m de hauteur environ, ramifiées, pubescentes de part en part sur les parties les plus jeunes, plutôt glabres.

Les stipules petites sont rapidement caduques.

Pétioles de 2 à 4 mm de long.

Les feuilles qui sont sur des petites branches sont composées de 1 à 2 folioles. Les folioles de couleur vert pâle oblongues-ovales, de 3 à 5 cm de long ; les bractées lancéolées sont caduques ; pédicelles de 2 à 8 mm de long.

Les fleurs sont jaunes, de 20 à 28 mm de long.

Les gousses épaisses et ligneuses, de 12 à 18 mm de long, sont presque rondes.

Croissent dans les prairies.

3) **BAPTISIA ALBA** (L) R. Br. Plantes de 1,50 m de hauteur environ, très ramifiées, glabres. Les stipules sont caduques.

Les pétioles sont minces, de 5 à 10 mm de long.

Les folioles sont cunéiformes, lancéolées, obtuses, de 2 à 4 cm de long sur 8 à 15 mm de large.

Les grappes sont dressées, de 2 à 5 dm de long et peu nombreuses.

Les bractées sont caduques.

Les fleurs sont blanches, 12 à 18 mm de long. Calice bilabié, lèvre supérieure entière et lobes inférieurs triangulaires.

Les gousses de couleur brune sont cylindriques, de 2 à 3 cm de long et 6 à 8 mm de diamètre.

Cette belle plante croit dans le terrain sablonneux et sec des plaines côtières des USA.

4) **BAPTISIA LEUCANTHA** T. et G. De 1 à 2 mètres de hauteur, ces plantes sont ramifiées, glabres et glauques. Les stipules sont lancéolées, de 5 à 10 mm de long, quelques-unes sont persistantes.

Les feuilles sont pétiolées, lancéolées, de 3 à 6 cm de long, quelques-unes sont persistantes.

Les bractées ovales-lancéolées sont caduques.

Les fleurs blanches ou avec une teinte pourpre sur l'étendard mesurent 18 à 25 mm de long.

Les gousses sont noires, ellipsoïdes-oblongues, de 2,5 à 4 cm de long, 8 à 12 mm de diamètre et terminées par un bec court.

Croissent dans les prairies et clairières en juin et juillet.

5) **BAPTISIA LEUCOPHEA** Nutt. Plantes de 4 à 8 dm de hauteur, pubescentes. Les stipules sont persistantes, lancéolées.

Les feuilles les plus basses ont 4 cm de long et les plus hautes sont réduites.

Les pétioles ont 2 à 5 mm de long.

Les rameaux simples, de 1 à 2 dm de long.

Les bractées sont persistantes, lancéolées ou oblongues, de 1 à 3 cm de long.

Les fleurs sont blanches ou crème, de 20 à 28 mm de long.

Les gousses ellipsoïdes de 3 à 5 cm de long, pubescentes, se terminent en un bec remarquable.

Croissent dans les prairies et clairières en mai et juin.

6) **BAPTISIA TINCTORIA** (L) R. Br. Plantes très glabres de 1 m de hauteur environ ; les stipules sont sétacées, inapparentes. Les pétioles de 1 à 3 mm de long.

Les folioles obovales, arrondies au sommet ont 1 à 2 cm de long et dépassent rarement 4 cm.

Les grappes sont très nombreuses.

Les fleurs sont jaunes, environ de 8 à 13 mm de long et parfois de plus de 16 mm ; le calice est glabre, les lobes de la lèvre inférieure sont de 1 à 2 mm de long.

Les gousses sont lenticulaires de 9 à 15 mm de long, de 6 à 8 mm d'épaisseur, portées par des pédoncules de 5 à 10 mm de long.

Croissent sur du sol sec et stérile en juin et juillet.

Dans cette espèce, on distingue deux variétés :

— Var. **tinctoria** : les grappes ont 2 à 6 cm de long, ou quelquefois légèrement plus au moment de la fructification.

— Var. **projecta** Fern. : les grappes moyennes sont plus longues ; celle qui termine l'axe central a 1 ou 2 dm de long, même plus.

7) **BAPTISIA AUSTRALIS**. (L) R. Br. C'est un faux-indigo bleu ; plante de 1,50 m de hauteur, le **Baptisia australis** est glabre, portant un ou deux rameaux terminaux allant jusqu'à 4 dm de long. Les stipules sont communément persistantes jusqu'à l'anthèse au moins

sur certaines parties de la plante ; elles sont lancéolées ou obovales mesurant de 8 à 20 mm de long.

Les folioles sont cunéiformes oblongues, obtuses, de 2 à 8 cm de long.

Les fleurs sont d'un bleu foncé, panachées de blanc et disposées en grappes de plusieurs pieds de long. Le calice a la lèvre supérieure entière ou légèrement découpée ; les lobes de la lèvre inférieure sont ovales ou triangulaires.

Les gousses ont 3 à 6 cm de long, terminées par un bec effilé.

Croissent dans des terrains rocheux et gravillonneux des bois et des prairies.

Il existe deux variétés :

— Var. **australis** : les fleurs ont une longueur habituelle de 20 à 27 mm ; les pétioles ont une longueur supérieure à 5 mm ; les plus grandes folioles mesurent 4 à 8 cm ; les gousses ont 3 à 5 cm de long, les pédoncules dépassant à peine le calice.

— Var. **minor** (Lehm) Wats. Les fleurs ont de 28 à 35 mm de long ; les pétioles ont une longueur inférieure à 5 mm, les folioles ont moins de 4 cm de long ; les gousses mesurent jusqu'à 6 cm portées par des pédoncules presque deux fois plus longs que le calice.

TRAVAUX PERSONNELS

ETUDE MORPHOLOGIQUE

Cette espèce s'acclimate très bien sous nos climats. Elle constitue en horticulture une belle espèce ornementale que l'on peut obtenir soit par germination des graines (que l'on sème d'avril en juillet, en plein air et dans un compost léger ; on repique les plantes en pépinière, puis on les met en place en automne), soit par éclats. Les plantes ne fleurissent qu'au bout de trois à quatre ans.

Les échantillons qui font l'objet de notre travail ont été récoltés au jardin botanique de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon. Les semis ont été effectués en 1960 et les récoltes en 1964.

La plante se présente sous forme de plante herbacée vivace, à souche vigoureuse et pourvue d'un système racinaire important. A la floraison, elle atteint environ 1,50 m de hauteur.

Les feuilles

L'espèce est caractérisée par les feuilles pétiolées trifoliées. Les folioles sont oblongues, acuminées au sommet et légèrement atténuées à la base. La dimension moyenne est de 40 mm de long sur 20 mm de large. On trouve à la base des feuilles des stipules sétacées.

Tige

La tige a 3 ou 4 mm de diamètre et elle présente une écorce verte. La cassure n'est pas nette.

Les inflorescences

La floraison sous le climat lyonnais a été obtenue en juin. Les grappes de fleurs lâches, de 40 cm de long, sont de couleur bleue



Fig. N° 1

Baptisia australis, plante âgée de 4 ans, cultivée au jardin botanique
de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon

et tachetées de blanc. Elles sont apparues latéralement sur les rameaux et le nombre de fleurs est de 30 en moyenne.

Les fleurs à large étendard présentent une carène courte violette. Les pétales sont soudés, les étamines libres et le calice campanulé est bilabié à 4 ou 5 dents inégales.

Les fruits

La fructification a été obtenue en juillet. Les gousses renflées, peu pédicellées sont apiculées. A maturité, les gousses noircissent. Elles contiennent une vingtaine de graines.

Les graines

Les graines provenant d'un ovule campylotrope ont 5 mm de long et 1 mm d'épaisseur. Le tégument est blanchâtre et membraneux. L'embryon est curviligne entre deux énormes cotylédons.

Les racines (fig. n° 2).

Le système racinaire est constitué par une souche rhizomateuse à racines abondantes. Sur les pieds que nous avons arrachés la longueur des racines atteint en moyenne 90 cm de long.

De 5 à 7 mm de diamètre, les racines présentent une écorce blanchâtre. La section donne un cylindre central jaune clair qui occupe le 2/3 de celle-ci. La cassure est fibreuse ; l'odeur nulle, la saveur âcre et nauséuse.

La souche récoltée comprenait une quantité assez forte de tiges souterraines dont les bourgeons servant au développement de la plante.



Fig. N° 2
Racine de *Baptisia australis* R. Br

ETUDE ANATOMIQUE

Racine. - (Fig. n° 3 et 4).

Des coupes transversales ont été pratiquées sur des échantillons ayant 4 ou 5 mm de diamètre. La racine se présente sous forme de structure rayonnée avec formations secondaires et amas de fibres très développés. On distingue :

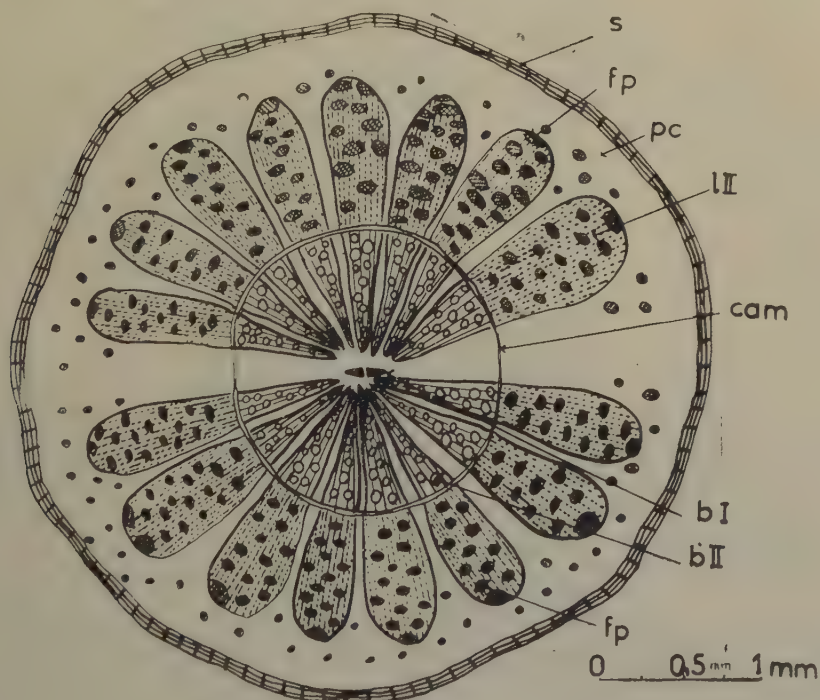


Fig. N° 3

Coupe transversale de racine de *Baptisia australis* R. Br (Schéma)

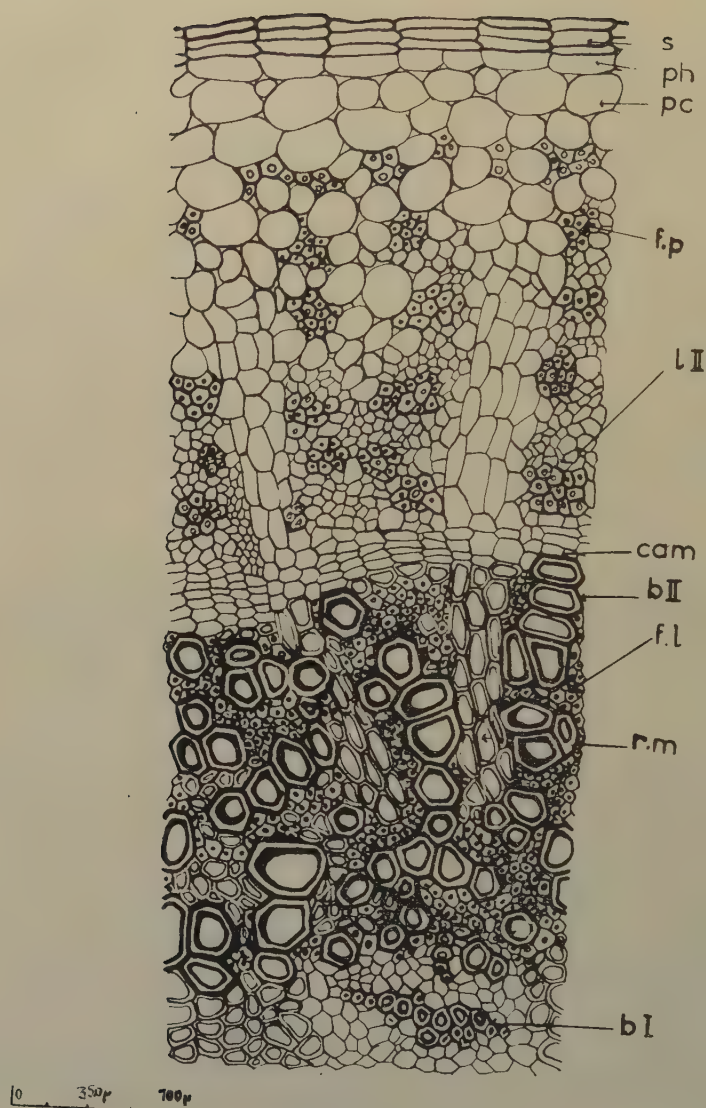


Fig. N° 4
Coupe transversale de racine (dessin)

s : suber
fp : fibre peryclicque
pc : parenchyme corticale
II : liber secondaire

cam : cambium
b I : bois primaire
b II : bois secondaire
rm : rayon médulaire

— un suber mince formé de 2 ou 3 assises de cellules allongées tangentiellement.

— un parenchyme cortical bourré d'amidon, d'amas de fibres.

— le cylindre central est volumineux, il est coupé par des rayons médullaires bisériés et quelquefois plurisériés s'évasant dans le parenchyme cortical et séparant des cônes libériens pointus renfermant des fibres. Le système libéro-ligneux est séparé par un cambium ; le liber a un aspect normal et le bois possède un parenchyme ligneux entièrement lignifié.

— la moelle est très réduite avec quelques îlots de bois primaire.

Folioles. - (Fig. n° 5)

Des coupes ont été faites au niveau de la nervure centrale.

— la nervure : elle est beaucoup plus saillante sur la face inférieure que sur la face supérieure. L'épiderme est cutinisé. L'arc libéro-ligneux est convexe, comprenant une structure ligneuse rayonnée et entouré par un péricycle fibreux discontinu.

— le limbe : le limbe comporte deux assises de tissu palisadique sans oxalate de calcium surmontant un tissu peu lacuneux.

Tige

Sur une coupe transversale d'une tige ayant 2 à 3 mm de diamètre, nous distinguons de la périphérie vers le centre :

— 3 ou 4 assises de suber formées de cellules cubiques.

— un parenchyme cortical réduit formé de cellules allongées tangentiellement à paroi mince, riches en amidon.

— le système libéro-ligneux est continu ; le liber est surmonté d'un péricycle fibreux discontinu ; le bois est constitué par un parenchyme lignifié à cellules à lumen étroit.

— la moelle est assez développée et formée de cellules lignifiées.

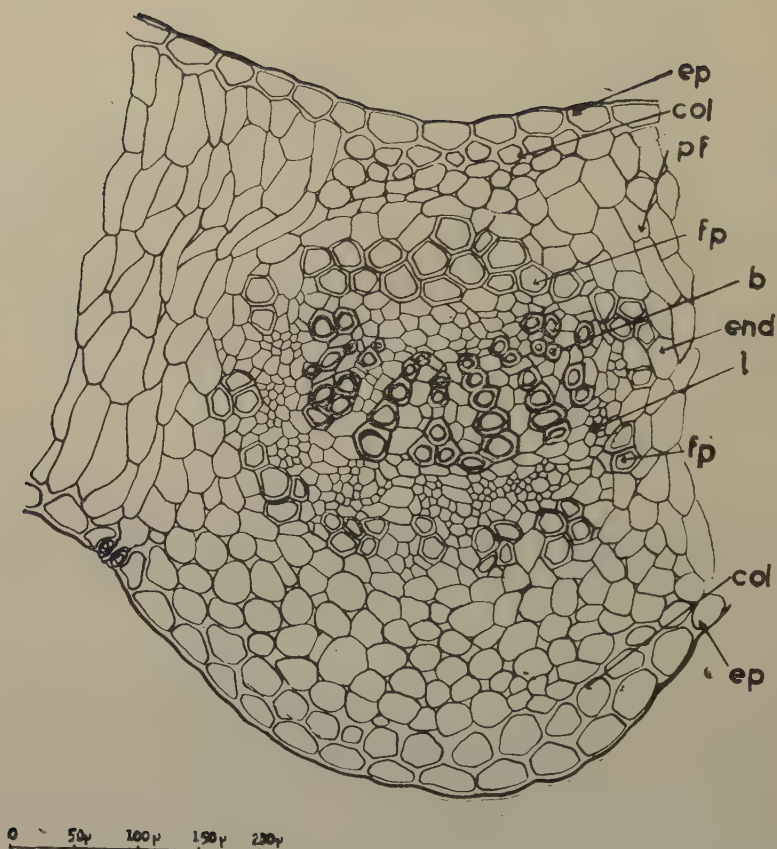


Fig. N° 5
Coupe transversale de foliole (dessin)

ep : épiderme
col : collenchyme
pf : parenchyle foliaire

b : bois
end : endoderme
l : liber

DEUXIEME PARTIE

ETUDE CHIMIQUE

TRAVAUX ANTERIEURS

Parmi les espèces de **Baptisia** décrites dans l'index Kewensis, un petit nombre seulement a fait l'objet d'investigations chimiques. Des substances les plus intéressantes retirées du **Baptisia**, les alcaloïdes paraissent être les constituants les plus importants ; les autres composés (glucosides, acides aminés, flavonoïdes) ne sont que rarement mentionnés.

KLEIN et FARKASS (E) (33) ont signalé la seule présence de cytisine dans plusieurs espèces de **Baptisia**. Il paraissait toutefois improbable que ces plantes ne puissent contenir qu'un seul alcaloïde.

Les espèces les plus étudiées sont les suivantes :

- **Baptisia tinctoria** R. Br
- **Baptisia leucantha** T et G
- **Baptisia leucophea** Nutt
- **Baptisia australis** R. Br

1) **Baptisia tinctoria** R. Br.

GORTER (18), REUTER (48), SCHINDLER (49) ont donné la composition chimique de la plante. Cultivée aux Etats-Unis, cette plante livre aux droguistes outre ses matières résineuses, de la cytisine (0,015 %), de la baptisine, de la pseudobaptisine, du baptisol dans les feuilles.

2) **Baptisia leucantha** T et G

KLEIN et FARKASS ont mentionné la présence de la cytisine dans les feuilles et les racines de **Baptisia leucantha** T et G. En 1961,

KUPCHAN et DAHLE (34) ont isolé de la partie aérienne de la plante deux alcaloïdes dans la proportion de 80/20 dont l'un d'eux est de la d-spartéine. Précipité en picrate de spartéine, il se présente sous forme de prisme ayant un point de fusion de 206-208° C.

3) *Baptisia leucophea* Nutt

En 1962, BREHM (8) a signalé pour la première fois dans **Baptisia**, les alcaloïdes mis à part, des acides aminés libres, des flavonoïdes et d'autres composés phénoliques. Au point de vue alcaloïdique, l'auteur a trouvé 3 alcaloïdes principaux, la cytosine N-méthyl cytosine, anagrine (à la place de spartéine) et un alcaloïde inconnu. Les acides aminés sont au nombre de 24 dont 18 ont été identifiés. En plus de ces substances, d'autres corps ont été signalés ; des flavonoïdes et des anthocyanes (delphine, pétunidine, malvidine).

4) *Baptisia australis* R. Br

MARION et OUELLET (38) ont isolé de cette plante 4 alcaloïdes dont les deux principaux sont la N-méthyl cytosine et la d-spartéine. Le troisième en importance est la cytosine et le dernier P2, en très petite quantité, n'a pas été caractérisé.

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I

ESSAIS PRELIMINAIRES

I. — TECHNIQUES UTILISEES

Teneur en eau :

Perte de poids par séjour à l'étuve : 2 g de drogue pulvérisée sont placés pendant 24 heures à l'étuve à 37° C, puis 24 h. à 60° C et enfin 2 heures à 100° C jusqu'au poids constant.

Recherche des essences :

L'essence est recherchée par entraînement à la vapeur dans un appareil en circuit fermé du type décrit dans la pharmacopée anglaise et américaine.

10 g de feuilles sont introduits dans le ballon de l'appareil avec 300 ml d'eau distillée, on règle la distillation de manière à obtenir une goutte toutes les secondes. L'opération dure deux heures.

Recherche sur l'infusé à 5 % :

5 g de feuilles sont infusées dans 100 ml d'eau bouillante ; après filtration on ajuste à 100 ml. Le liquide obtenu est rouge orangé. Cet infusé présente une coloration jaune en lumière de Wood.

Recherche des dérivés flavoniques :

L'infusé donne nettement la réaction de SHIBATA (51) dite de la cyanidine : 1 ml de l'infusé est additionné de quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré puis de quelques copeaux de magnésium. Il se développe au bout de quelques minutes une coloration plus ou moins orangée, suivant l'organe étudié, passant dans l'alcool amylique.

Recherche des tanins :

Quand on ajoute à un infusé à 5 % quelques gouttes de solution diluée de chlorure ferrique, on voit se développer une coloration noirâtre.

Si on additionne le même infusé de quelques gouttes d'acide chlorhydrique et que l'on porte à l'ébullition un précipité de couleur brunâtre se forme.

Le sous-acétate de plomb donne un précipité jaunâtre.

Recherche des dérivés quinoniques :

10 g de feuilles ont été imbibées avec la moitié de leur poids de HCl environ 5 N et mis à macérer 48 h. avec 10 parties du mélange éther-chloroforme (3—1 en volume). La solution organique a été concentrée de telle sorte que 1 ml corresponde à 2 g de feuille, puis épuisée par la soude à 10%. En présence des dérivés quinoniques la solution alcaline se colore en rouge.

Recherche des saponosides : indice de mousse.

Un décocté à 1% de drogue pulvérisée est préparé dans un erlenmeyer ; ce décocté ne mousse que faiblement. La détermination de l'indice de mousse se fait de la manière suivante : dans une série de tubes à essai de même diamètre on introduit des quantités croissantes de décocté et on complète à 10 ml avec de l'eau distillée. On bouche les tubes et on agite pendant 15 secondes ; la dilution du tube où la mousse atteint une hauteur de 1 cm et persiste au moins 15 minutes donne l'indice.

Dosage de l'azote total :

La méthode de dosage de l'azote total la plus applicable aux végétaux est celle qui repose sur le procédé de Kjeldhal, procédé qui a subi de nombreuses transformations et améliorations, mais dont le principe essentiel n'a pas été touché. Le principe de la méthode est le suivant : par attaque de la substance végétale avec de l'acide sulfurique concentré, à chaud, en présence de catalyseur (DUMAZERT et MARCELET), l'azote des composés minéraux et organiques est transformé en sulfate d'ammonium. Par distillation avec un excès de lessive alcaline, l'ammoniaque est mise en liberté, entraînée et recueillie dans l'acide sulfurique titré.

L'appareil employé pour la distillation et le dosage de l'ammoniaque est celui de PARNAS et WAGNER.

Recherche et dosage des alcaloïdes :

a) Recherche sur l'infusé à 5 % : quelques ml de cet infusé sont acidifiés par l'acide sulfurique environ normal et additionnés de quelques gouttes de réactif de Mayer ou de Bertrand : il se forme un précipité blanc.

b) Dosage par la méthode de STAS-OTTO : 50 g de drogue pulvérisée sont introduits dans un flacon de 500 ml et imbibés de 25 ml d'ammoniaque à 10 %, puis additionnés de 250 ml de mélange éthéro-chloroformique (3—1 en volume). On laisse macérer dans le flacon bouché, en agitant de temps en temps. On filtre alors dans une ampoule à décantation, rince le marc et agite le liquide d'extraction avec 25 ml d'acide sulfurique normal. L'épuisement est poursuivi jusqu'à ce que la liqueur acide séparée ne donne plus qu'un faible louche avec le réactif de Mayer. Les liqueurs acides réunies sont alcalinisées par un excès d'ammoniaque et épuisées par l'éther-chloroforme à plusieurs reprises. Les extraits éthéro-chloroformiques sont séchés sur sulfate de sodium anhydre, filtrés et évaporés à l'air dans un cristalliseur taré.

c) Extraction au Soxhlet : le matériel végétal (racine, feuille) broyé puis réduit en poudre fine est extrait au Soxhlet par le méthanol. L'épuisement dure 48 h. Le méthanol est ensuite évaporé sous pression réduite et le résidu d'évaporation repris par l'acide dilué. La solution acide est dégraissée par l'éther, neutralisée par la potasse et extraite par le chloroforme. L'extraction se fait jusqu'à ce que le liquide chloroformique ne précipite plus le réactif de Mayer.

Les extraits chloroformiques sont réunis puis évaporés sous pression réduite ; le résidu repris par une solution de HCl dilué, à chaud puis filtré après refroidissement sur du charbon. Le filtrat aqueux est alcalinisé avec de l'ammoniaque puis extrait avec le chloroforme. Les extraits chloroformiques sont réunis et évaporés à l'air dans un cristalliseur taré.

Etude chromatographique :

A. — Chromatographie sur papier : nous avons fait appel à la chromatographie descendante sur papier ; cette méthode a été utilisée tant pour les essais préliminaires que pour suivre l'extraction et la purification des substances isolées.

— Matériel : cuve de verre Shandon - Papier Arches 302.

— Durée de développement : la durée doit être suffisante pour obtenir au moins 150 mm de développement à partir de la tache de départ.

— Température : aussi constante que possible, ne variant pas plus ou moins 1° C, dans un local où elle est constamment contrôlée.

— Solvant : le mélange de Partridge : n butanol-acide acétique-eau (4-1-5 v/v).

Le mélange alcool isoamylique-éther de pétrole-acide acétique-eau (3-1-3-3 v/v).

B. — Chromatographie sur couches minces : Parallèlement aux essais sur papier, nous avons eu recours aussi à la chromatographie sur couches minces pour l'étude des substances extraites et aussi pour vérifier le degré de pureté.

Techniques de la chromatographie sur couches minces : on prépare de différentes façons des couches régulières d'épaisseur uniforme. La technique la plus employée est celle de STAHL (55). On trouve dans le commerce deux types d'appareils. Avec l'un on ne peut faire que des couches d'une épaisseur déterminée (environ 250 m μ) ; avec l'autre l'épaisseur peut aller de 0 à 2 mm.

L'équipement de base pour la chromatographie sur couches minces comprend :

- un étaleur ;
- un cadre en matière plastique pour la préparation de 5 plaques de 20 x 20 cm ;
- des plaques de verre d'épaisseur identique (4 mm) de 20 x 20 cm. ;
- une cuve rectangulaire avec couvercle à poignée pour les plaques de 20 x 20 cm ;
- un gabarit gradué en plexiglas transparent ;
- un portoir en métal léger pour 10 plaques de 20 x 20 cm ;
- deux pipettes graduées de 10 μ l,

- un flacon de 50 ml de solution témoin (0,1 % dans le benzène) contenant trois colorants témoins pour la détermination de l'activité ;
- un paquet de 500 g de sel de silice (Kieselgel) de Merck.

Préparation de la couche :

La préparation de la couche comporte trois étapes :

1. — Mise en place des plaques et préparation de l'étaleur ;
2. — Préparation d'une suspension de matière à étaler et introduction dans l'étaleur ;
3. — Etalement sur plaques.

Traitements des plaques préparées :

1) Séchage : après l'étalement on laisse les plaques en place, jusqu'à ce que la surface devienne tout à fait mate. Le mieux est de laisser sécher une nuit à l'air ; de cette façon, il se forme des couches qui adhèrent très fortement au verre. Pour beaucoup de travaux ce genre de plaques suffit.

2) Activation : lorsque les plaques sont sèches, on les introduit dans une étuve. La température et le temps de chauffage dépendent de l'activité choisie. Un chauffage de 30 minutes à 150° C donne une activité qui correspond à peu près à celle de l'alumine neutre standardisée « Merck ». En chauffant plus longtemps et à des températures plus élevées, on obtient des couches plus actives.

3) Stockage : du fait que les plaques perdent leur activité à l'air humide, on les conserve en présence d'un agent desséchant (gel de silice bleu, alumine activée, chlorure de calcium) dans un dessiccateur de 30 cm de diamètre.

Vérification des plaques de gel de silice :

Les couches doivent avoir une apparence homogène quand on les regarde par transparence ou par réflexion. La surface doit être lisse et dépourvue des grains un peu gros. L'adhérence doit être telle qu'en passant légèrement le doigt sur la couche on ne l'endommage pas sérieusement.

C. — **Révélation des spots** : Nous avons fait appel aux réactifs physiques et chimiques.

1) Le révélateur de choix est la lumière de Wood.

2) Nous avons, en général, après l'examen à la lumière de Wood, procédé à la pulvérisation avec des réactifs chimiques :

a) Révélation des alcaloïdes et des bases azotées.

— Réactif de Dragendorff (15).

Pour les papiers, nous avons utilisé le réactif de Dragendorff modifié par AMELINK à l'iodobismuthate de K : 7 g de IK sont chauffés avec 18 ml d'eau et 3 ml de HCl 4 N à ébullition durant laquelle on ajoute petit à petit 15 g de nitrate basique de bismuth. On étend la solution de la même quantité d'eau. Au moment de l'emploi on mélange 2 ml de cette solution avec 3 ml de HCl à 25 % et on complète avec de l'eau à 100 ml.

Pour les plaques on emploie le réactif modifié selon MUNIER (44). On mélange 1 volume d'une solution de 17 g de sous-nitrate de bismuth et de 200 g d'acide tartrique dans 800 ml d'eau et un volume d'une solution de 160 g de IK dans 400 ml d'eau. Au moment de l'emploi, on dilue 50 ml de cette solution mère dans 500 ml d'eau et l'on dissout 100 g d'acide tartrique, pour avoir la solution à pulvériser.

— Réactif à l'iodoplatinate de potassium, 1 g de chlorure de platine est dissous dans 10 ml d'eau distillée, il lui est ajouté 250 g d'une solution de IK à 4 %. La solution est complétée ensuite à 500 ml avec de l'eau distillée.

Pour les plaques, nous avons utilisé le réactif à l'iodoplatinate de E. SCHLITTER (52). A 3 ml d'une solution de chlorure de platine à 10 % (Merck) on ajoute 97 ml d'eau et 100 ml d'une solution aqueuse de IK à 6 %. Le réactif peut se conserver assez longtemps dans des flacons bruns.

Le réactif à l'iodoplatinate donne une bonne différenciation pour la plupart des alcaloïdes. Non seulement il donne des couleurs caractéristiques, mais celles-ci se modifient encore pendant ou après la pulvérisation (60).

b) Révélation des flavanoïdes.

— Réactif au chlorure d'aluminium : en solution éthanolique à 2 %. Les flavones donnent une tache fluorescente jaune et les flavonols une tache fluorescence verte.

— Réactif au pentachlorure d'antimoine : en solution chloroformique. Les chalcones donnent une teinte rouge violacé.

— Potasse alcoolique à 5 % dans l'éthanol à 96°.

— Perchlorure de fer à 2 % dans l'éthanol à 96°.

— Acétate de magnésium à 2 % dans l'éthanol à 96°.

II. - RESULTATS

A. — LES FEUILLES

Teneur en eau :

Perte de poids par séjour à l'étuve : 70 %.

Cendres totales : 6,40 %

Recherches des essences : négative.

Recherche sur l'infusé à 5 %.

L'infusé présente une coloration jaune, accentuée par l'addition de quelques gouttes de soude. Il est jaune verdâtre en lumière de Wood.

Recherche des dérivés flavoniques.

L'infusé donne nettement la réaction de SHIBATA.

Recherche et dosage des tanins.

50 ml de l'infusé à 5 % sont additionnés de 10 ml de formol puis de 5 ml d'acide chlorhydrique concentré (réactif de STIASNY), le tout est chauffé pendant 30 minutes à une température inférieure à l'ébullition. Il ne se produit qu'un léger louche ; après filtration, le liquide clair est additionné d'un excès d'acétate de sodium, puis de quelques gouttes d'alun de fer à 1 % ; il n'y a pas changement sensible de la coloration, donc absence de tanins catéchiques et galliques en quantité notable.

Recherche des quinones.

Positive.

Recherche des saponosides : indice de mousse.

La mousse atteint 1 cm, mais ne persiste que 5 minutes dans le tube n° 10 (concentration 1 %) l'indice est donc inférieur à 100.

Dosage de l'azote total : 5 %.

Recherche et dosage des alcaloïdes.

— sur l'infusé l'addition de quelques gouttes du réactif de MAYER en milieu sulfurique provoque un précipité blanc.

— Dosage par la méthode de **Stas-Otto** : les alcaloïdes totaux des feuilles de **Baptisia australis** R. Br sont de l'ordre de 0,22 %. ils se présentent sous la forme d'un résidu brun, soluble dans le méthanol et l'éthanol.

Extraction par les solvants successifs :

Les rendements en extraits secs avec avec les différents solvants sont les suivants :

— Ether de pétrole :	2,77 %
— Chloroforme :	2,70 %
— Acétate d'éthyle :	4,25 %
— Alcool à 95° :	3,10 %

Etude en chromatographie :

A. — Etude en chromatographie sur papier

1. — Chromatographie d'une teinture de feuilles :

1 ml de teinture correspond à 1 g de drogue.

Chromatogramme de la teinture de feuilles de **Baptisia australis** R. Br.

Papier : Arches 302

Solvant : Partridge (4-1-5)

Rf	U.V.	U.V.-NH ₃	Cl ₃ Al	Cl ₃ Al-U.V.	Drag.	Iodopl.
0,89	Bleu-violet					
0,80	Bleuté					
0,65	Brun	Jaune	Jaune	Jaune		
0,61					Rose	Brun
0,56	Bleu fluo.	Violet fluo.				
0,45	Brun	Jaune foncé	Jaune	Jaune		
0,44					Rose	Brun
0,36	Bleu	Jaune clair				
0,34					Rose	Brun
0,29	Jaune	Jaune orangé				
0,26	Violet					

On remarque aux Rf suivant :

— 0,61 : une tache réagissant en rose avec le réactif de Dragendorff et en brun avec l'iodoplatinate.

— 0,44 idem

— 0,34 idem

— 0,65 : tache brune à l'U.V. et jaune avec le trichlorure d'aluminium.

— 0,45 idem

Les trois premières taches sont des alcaloïdes et les deux dernières sont des dérivés flavoniques.

2. — Chromatogramme des extraits obtenus par des solvants successifs :

— L'extrait éthéro-pétrolique ne donne aucune tache.

— L'extrait chloroformique donne une tache bleue.

— L'extrait éthéro-acétique donne les mêmes taches que le chromatogramme d'une teinture normale.

— L'extrait éthanolique donne un chromatogramme dans lequel plusieurs taches sont absentes (Rf 0,89, Rf 0,80).

B. — Etude en chromatographie sur couches minces.

Rf	U.V.	U.V.-NH ₃	Cl ₃ Al	Drag.	Iodopl.
0,79	Bleu-violet	Jaune clair			
0,74	Brun		Jaune		
0,65	Violet				
0,55	Brun		Jaune		
0,02				Rose	Brun

Remarques :

— Rf 0,74 et 0,55 correspondent aux dérivés flavoniques.

— Les taches alcaloïdiques sont restées au point de départ.

B. — LES RACINES

Teneur en eau : 40 %

Cendres totales : 6,50 %

Recherche des essences : négative

Recherches des dérivés flavoniques : négative

Recherche et dosage des tanins : présence des tanins catéchiques et galliques en petite quantité.

Recherche des quinones : Positive.

Recherche des saponosides : négative

Dosage de l'azote total : 1,50 %

Recherche et dosage des alcaloïdes :

— Réaction positive avec le réactif de Mayer

— La méthode de STAS-OTTO donne 0,346 % d'alcaloïdes totaux.

Extraction par les solvants successifs :

— Ether de pétrole :	0,53 %
— Chloroforme :	0,32 %
— Acétate d'éthyle :	0,70 %
— Ethanol :	2,50 %

Etude chromatographique :

A. — Chromatographie sur papier

Papier : Arches 302

Solvant : Partridge (4-1-5)

1. — Teinture de racine

Rf	U.V.	U.V.-NH ₃	Cl ₃ Al	Drag.	Iodopl.
0,91		Bleu pâle			
0,85	Violet				
0,19	Grisâtre				
0,62		Gris	Jaune		
0,61				Rose	Brun
0,57	Violet				
0,44				Rose	Brun
0,37	Gris				
0,34				Rose	Brun
0,30	Vert				
0,15	Jaune sale	Bleu pâle			
0,21	Violet				

Remarques :

- Trois taches alcaloïdiques : Rf 0,61, Rf 0,44, Rf 0,34.
- Une tache grisâtre à Rf 0,69 (isoflavone ?)
- Absence des dérivés flavoniques.

2. — Chromatogramme des extraits obtenus par des solvants successifs :

- L'extrait éthéro-pétrolique : une tache bleue à Rf 0,91
- L'extrait chloroformique : apparition des taches alcaloïdiques.
- L'extrait éthéro-acétique donne un chromatogramme semblable à celui d'une teinture normale ; seules les taches alcaloïdiques manquent.
- L'extrait éthanolique donne le même chromatogramme que celui de l'extrait éthéro-acétique.

B. — Chromatographie sur couches minces.

Chromatographie d'une teinture de racine :

Rf	U.V.	U.V.-NH ₃	Cl ₃ Al	Drag.	Iodopl.
0,80	Bleu clair	Jaune			
0,72	Jaune				
0,67	Violet	Violet sombre			
0,60	Gris	Jaune			
0,46	Violet				
0,37	Brun	Jaune	Jaune		
0,25	Jaune				
0,12	Bleu				
0,10				Rose	Brun
0,06				Rose	Brun

Remarques :

- Les taches alcaloïdiques sont restées très près du point de départ.
- Les taches de coumarine et isoflavones sont confuses.

Conclusion.

Nous avons trouvé dans **Baptisia australis** les éléments suivants : alcaloïdes, dérivés flavoniques, dérivés quioniques, etc... Notre étude portera spécialement sur les dérivés flavoniques des feuilles et les alcaloïdes de la racine, éléments utilisés en thérapeutique.

CHAPITRE II

SUBSTANCES AZOTEES

I. — ETUDE DES ALCALOIDES

TRAVAUX ANTERIEURS

MARION et OUELLET ont découvert au moyen d'un test micro-chimique la présence dans **Baptisia australis** R. Br (racine et feuille) cultivée dans des fermes expérimentales d'Ottawa (Canada) quatre alcaloïdes qui sont : N-méthyl cytisine, d-spartéine, cytisine, et un inconnu appelé par les auteurs P2. A l'exception de P2 tous les corps sont connus et ont pu être isolés à partir d'autres sources. Les auteurs ont signalé que les mêmes alcaloïdes ont été retrouvés dans **Anagyris foetida** (25), à l'exception de P2 qui est substitué par l'anagyrine.

Baptisia australis R.Br contient aussi une substance « A » non nitrée qui peut être hydrolysée par les acides en nouvelle substance « B ». Les 2 substances sont solubles dans la soude aqueuse.

Partie expérimentale.

L'extraction des alcaloïdes se fait au Soxhlet avec du méthanol. Le méthanol est évaporé et le résidu repris par de l'eau acidifiée. La solution aqueuse alcalinisée est extraite par l'éther qui donne la substance A et par le chloroforme qui donne la substance B. L'extrait A est évaporé sous vide et on obtient les fractions suivantes :

- fraction I, huile incolore
- fraction II, huile jaune dont un partie cristallise au repos.
- fraction III, huile jaune qui cristallise au repos.
- fraction IV, huile épaisse brunâtre.
- fraction V, huile épaisse, brune.

1. — Isolement de la spartéine.

La fraction I sans couleur, dissoute dans du méthanol est additionnée d'une solution d'acide picrique à saturation dans le même solvant. Après refroidissement un picrate se sépare. Le produit obtenu soumis à 2 recristallisations dans du méthanol bouillant donne des aiguilles prismatiques jaune citron ayant un point de fusion de 208° C.

La fraction II donne également, avec la solution d'acide picrique, du dipicrate de d-spartéine.

2. — Isolement de la N-méthyl cytisine.

La liqueur mère provenant de la fraction II et la fraction III donnent avec la solution d'acide picrique des aiguilles jaunes fondant à 192-193° C ; mais après 3 h. de concentration dans le même solvant elle fond à 234° C. Un échantillon de picrate de N-méthyl cytisine fourni par MANSKE et MARION fond également à 132° C ; soumis au même traitement que le produit isolé l'échantillon possède le même point de fusion (234° C).

3. — Isolement de la cytisine.

Les fractions IV et V additionnées d'acide picrique donne un picrate se présentant sous forme de plaquettes jaunes fondant à 238° C.

4. — Isolement de l'alcaloïde P2.

Le sublimat cristallin obtenu au cours de la purification de la cytisine fond à 293° C ; après deux recristallisations à partir de l'éther-méthanol il fond à 300° C.

La quantité de base est si faible qu'on doit la convertir en perchlorate afin d'augmenter le poids du produit. Le sel obtenu donne après deux recristallisations des aiguilles incolores fondant à 193° C.

Le matériel était insuffisant pour permettre une meilleure caractérisation de P2.

Répartition de l'alcaloïde dans le *Baptisia australis* R. Br

Suivant GORIS (19), la répartition de l'alcaloïde est la suivante:

— tige : épiderme, parenchyme, liber, rayons médullaires.

— feuille : épidermes, parenchyme, surtout dans la nervure principale ; liber de cette nervure.

— fruit : L'épicarpe est riche en principe alcaloïdique, le mésocarpe beaucoup moins ; on en trouve dans le funicule, dans le liber des faisceaux. L'ovule est riche en alcaloïde.

TRAVAUX PERSONNELS

A. — EXTRACTION

Les essais préliminaires d'une teinture au 1/5 de racine de **Baptisia australis** R. Br. révèlent la présence de deux alcaloïdes ; sur un extrait plus concentré nous avons repéré le troisième ; quant au quatrième, encore inconnu au point de vue chimique, il ne peut être mis en évidence que sur un substratum d'alcaloïdes totaux.

Les parties aériennes et les racines de la plante récoltée au mois de Septembre 1963 sont étudiées séparément, mais renferment les mêmes alcaloïdes de même que les graines. Après ces essais préliminaires notre recherche se porte essentiellement sur les alcaloïdes de racine, éléments utilisés en Homéopathie.

Méthode d'extraction.

Les racines sèches, broyées et réduites en poudre fine sont extraites au Soxhlet avec du méthanol. Après quarante-huit heures d'extraction le méthanol est recueilli puis évaporé à sec sous vide. Le résidu d'évaporation se présente sous forme d'huile de couleur brun foncé, d'odeur caractéristique. Repris par l'eau rendue acide au rouge de congo par l'addition de HCl, le résidu est porté au bain-marie pendant 9 h. Après refroidissement la solution aqueuse acide est filtrée et l'insoluble remis à chauffer au bain-marie avec de l'acide chlorhydrique dilué. Le tout est filtré et les extraits aqueux acides sont réunis puis dégraissés par l'éther.

La solution aqueuse ainsi dégraissée est neutralisée par la potasse puis extraite par le chloroforme. L'extraction se poursuit jusqu'à ce que l'extrait chloroformique ne donne plus de louche avec le réactif de MAYER. On réunit les extraits chloroformiques puis on fait évaporer à sec sous pression réduite ; le résidu d'évaporation est repris par une solution du HCl dilué à chaud et filtré à froid sur du charbon.

Le filtrat alcalinisé avec de l'ammoniaque est extrait par le chloroforme. L'opération se fait comme précédemment et les extraits chloroformiques sont réunis et évaporés sous vide. Le résidu est repris par une petite quantité de méthanol.

Cette solution méthanolique donne par analyse chromatographique quatre alcaloïdes.

B. — ETUDE DES ALCALOÏDES EXTRAITS

Dans ce travail notre but est de donner, au point de vue alcaloïdique, une étude comparative avec celle de MARION et OUELLET sur **Baptisia australis** R. Br cultivé dans des fermes expérimentales d'Ottawa (Canada).

Le plan de notre travail est partagé en 3 parties :

- Etude qualitative des alcaloïdes sous forme de picrate.
- Dosage des alcaloïdes extraits par spectrophotométrie sur des éluats obtenus à partir des chromatogrammes en papier.
- Etude de l'alcaloïde inconnu : P2

1) Etude qualitative des alcaloïdes extraits.

L'étude de **Baptisia australis** a été faite en détail par les auteurs canadiens au point de vue alcaloïdique ; nous allons essayer, sur la même plante mais cultivée sous nos climats de retrouver tous les alcaloïdes précités.

A une solution méthanolique concentrée d'alcaloïdes totaux nous avons ajouté de l'acide picrique en solution saturée dans de l'éthanol. A la première goutte nous avons eu un abondant précipité jaune. L'addition de l'acide picrique continue pendant un certain temps (2 ml environ) ; le précipité est recueilli par centrifugation puis examiné au microscope. Il se présente sous forme de paillettes jaune-citron. L'examen chromatographique (solvant : éthanol-ammoniaque 2 %) en présence d'un témoin cytisine révèle la dissociation du picrate qui libère l'alcaloïde de son sel, alcaloïde ayant le même Rf que le témoin.

Sur la solution méthanolique restant dans l'Erlenmayer après la récolte de la première fraction nous avons recommencé la même opération mais cette fois-ci jusqu'à ce que la goutte de la solution

d'acide picrique ne provoque plus la précipitation. Les précipités sont recueillis par centrifugation et examinés au microscope. Ils se présentent sous forme de mélange d'aiguilles jaunes et d'aiguilles prismatiques de même couleur. La chromatographie sur papier en présence des témoins nous renseigne sur l'identité de ces alcaloïdes. Il s'agit d'un mélange de spartéine et de N-méthyl cytisine.

Quant à l'alcaloïde P2, sa présence sous forme de trace est retrouvée sur les chromatogrammes.

En conclusions, nous avons repéré dans le substratum d'alcaloïdes totaux de racine en solution concentrée dans du méthanol les mêmes alcaloïdes signalés par MARION et OUELLET.

II) Dosage des alcaloïdes isolés.

Les racines sèches (150 g) broyées sont extraites au Soxhlet avec du méthanol. Elles donnent à la fin de l'opération une quantité brute d'alcaloïdes de 0,52 g ce qui représente 0,346 % d'alcaloïdes totaux.

Ces alcaloïdes sont dissous dans 25 ml d'éthanol. C'est sur cette solution alcoolique que nous avons procédé à l'isolement par chromatographie sur papier puis au dosage par spectrophotométrie.

La chromatographie de cette solution alcaloïdique a été faite sur papier d'Arches 302, le dépôt de 1,5 ml étant mis sur bande continue de 40 cm en présence de deux spots témoins déposés aux deux extrémités de la feuille. Le solvant utilisé est le mélange de Partridge.

Sur le chromatogramme sec, nous avons révélé les deux spots témoins avec le réactif à l'iodoplatinate de K, ce qui met en évidence quatre alcaloïdes d'importance inégale. La cytisine (R_f 0,34) est en quantité importante, suivie par ordre décroissant de la spartéine (R_f 0,61), de la N-méthyl cytisine (R_f 0,44) et finalement de l'alcaloïde P2 (R_f 0,60). Les zones correspondant à ces différents alcaloïdes sont découpées d'abord en bandes puis en petits morceaux et éluées avec de l'éthanol séparément dans un volume convenable pendant 4 à 5 jours par macération à froid et en agitant fréquemment. On vérifie la dissolution totale de l'alcaloïde dans le solvant en prélevant un des petits morceaux de papier qui ne doit plus présenter de traces d'alcaloïdes.

Les éluats sont recueillis et ensuite dilués à un volume connu.

Technique de dosage :

Principe :

Le dosage est basé sur la mesure des variations de l'extinction au maximum d'absorption en fonction de la concentration.

Appareils.

- Spectrophotomètre de Jobin et Yvon.
- Spectrophotomètre de « LERES » type Spila.

Spectres.

I. — Spectre ultra-violet de la cytosine pure.

La cytosine pure provenant du laboratoire Fluka A.G. en solution dans l'éthanol présente :

- deux maximums à 234 m μ et 310 m μ
- deux minimums à 218 m μ et 255 m μ

II. — La spartéine (sulfate) du laboratoire Biochemical Research, Los Angeles, présente un maximum d'absorption ultra-violet à 208 m μ .

III. — La N-méthyl cytosine que nous avons isolée, donne dans l'ultra-violet un spectre identique à celui de la cytosine, c'est-à-dire deux maximums à 234 m μ et 310 m μ et deux minimums à 218 m μ et 255 m μ .

— Coefficient d'extinction de la cytosine et de la spartéine.

1. - Nous avons préparé une courbe d'étalonnage à partir d'une solution éthanolique de cytosine pure. Cette solution montre que les densités optiques au maximum d'absorption varient de façon linéaire en fonction de la concentration en alcaloïde entre les limites de 5 μ g par ml et 25 μ g par ml. Au delà la loi Beer-Lambert n'est plus respectée. Toutes ces opérations se font à la longueur d'onde de 310 m μ .

Les tableaux suivants indiquent les valeurs de densités optiques pour des concentrations croissantes et connues de cytosine.

Quantité de cytosine

en μ g/ml	5	10	15	20	25
Densités optiques	0,15	0,30	0,45	0,57	0,71
(moyenne sur 5 mesures)					

Le coefficient d'extinction est calculé selon l'équation suivante :

$$E \frac{\%}{1 \text{ cm}} = \frac{1}{C d} \times \log \frac{I_0}{I}$$

ou $C = \text{g/100 ml}$
 $d = 1 \text{ cm}$
 $\log \frac{I_0}{I} = \text{densité optique}$

Les densités optiques moyennes pour la cytosine pure déterminées sur 5 courbes d'étalonnage au point d'abscisse correspondant à 10 $\mu\text{g/ml}$ sont égales à 0,285.

$$E \frac{\%}{1 \text{ cm/310 m}\mu} = \frac{1}{0,001} \times 0,285$$

$$= 285$$

Ce coefficient d'extinction, en absence de témoin pur, a été également utilisé pour le dosage de la N-méthyl cytosine qui possède le même spectre d'absorption que la cytosine.

2. — Coefficient d'extinction de la spartéine.

Nous avons opéré de la même manière que pour la cytosine. Le tableau suivant indique les valeurs de densités optiques pour des concentrations en alcaloïdes comprises entre 100 et 400 μg par ml.

Quantité de spartéine

$\mu\text{g/ml}$	100	200	250	300	400
Densités optiques	0,17	0,32	0,37	0,47	0,61
(moyenne sur 5 mesures)					

Ces opérations se font à la longueur d'onde de 208 $\text{m}\mu$. A cette longueur d'onde les valeurs de densités optiques moyennes, en spectrophotométrie différentielle (LERES « Spila ») déterminées sur 5 courbes d'étalonnage sont égales à 0,155.

Le coefficient d'extinction de la spartéine à l'état de sulfate est de :

$$E \frac{\%}{1 \text{ cm/208 m}\mu} = \frac{1}{0,001} \times 0,155$$

$$= 155$$

— Détermination de la concentration en alcaloïde de racine de *Baptisia australis* R. Br

1. — Cytisine

Les fragments de chromatogramme de cytisine sont élués 4 fois par de l'éthanol. Ces éluats sont réunis puis complétés à 400 ml ; cette solution diluée au 1/10 est passée au spectrophotomètre de Jobin et Yvon dans la longueur d'onde de 310 m μ . Nous avons trouvé une valeur en densité optique de 0,32 ; ce qui correspond à une concentration de :

$$285 = \frac{1}{C} \times 0,32$$

$$C = \frac{0,32}{285}$$

$$C = 0,0011 \text{ g/100g}$$

Compte tenu des dilutions et de la quantité de la solution alcaloïdique déposée sur le chromatogramme (3 ml) la quantité de cytisine dans 150 g de racine correspond à :

$$\frac{0,0011 \times 4000 \times 25}{100 \times 3} = 0,366 \text{ g}$$

soit 0,244 g pour 100 g de racine sèche.

2. — N-méthyl cytisine.

Les éluats provenant du chromatogramme de N-méthyl cytisine sont complétés à 50 ml ; cette solution diluée au 1/10 et passée au spectrophotomètre dans la longueur d'onde de 310 m μ donne 0,23 comme valeur de densité optique ; ce qui correspond à une concentration de :

$$C = \frac{0,23}{285}$$

$$C = 0,0008 \text{ g/ 100 g}$$

En effectuant le même calcul que la cytisine nous avons :

$$C = 0,033$$

soit 0,022 g pour 100 g de racine sèche.

3. — Spartéine

Complétés à 100 ml puis dilués au 1/10, les éluats de la spartéine sont passés au spectrophotomètre différentiel dans la longueur d'onde de 208 mμ. Nous avons noté une valeur de densité optique de 0,400 ; ce qui correspond à une concentration de :

$$155 = \frac{1}{C} \times 0,400$$

$$C = \frac{0,400}{155}$$

$$C = 0,0025 \text{ g/ 100 g de spartéine à l'état de sulfate ;}$$

soit : 0,00137 g/ 100 g de spartéine à l'état de base.

Compte tenu des dilutions et la quantité déposée sur le chromatogramme, la concentration en spartéine pour 150 g de racine est de :

$$\frac{0,00137 \times 1000 \times 25}{100 \times 3} = 0,114 \text{ g}$$

soit 0,076 g pour 100 g de racine sèche.

Résultat :

- Cytisine : 0,244 g/100 g de racine
- Spartéine : 0,076 g/100 g
- N-méthyl cytisine : 0,022 g/100 g

Ce qui fait un total de 0,342 g pour 100 g de racine sèche.

Le restant de l'ordre de 0,004 g/ 100 g est représenté par l'alkaloïde inconnu, P2.

III) Etude de l'alkaloïde inconnu : P2

MARION et OUELLET ont déjà signalé dans leurs travaux la petite quantité de P2 dans **Baptisia australis** R. Br. Elle est confirmée par le dosage que nous avons effectué dans le précédent chapitre.

Isolement.

Nous avons procédé par chromatographie sur papier à l'isolement de cet alkaloïde. L'étude de P2 est rendue difficile d'une part

par sa faible quantité et d'autre part par son isolement. Sur un chromatogramme révélé à l'iodoplatinate de K, les deux taches de spartéine et de P2 se touchent. Il est presque impossible de les séparer ; pour l'isolement nous avons coupé la partie inférieure de la bande. Plusieurs bandes de P2 sont ainsi coupées puis éluées avec de l'éthanol. L'élution se fait à froid pendant 48 h. par macération en agitant fréquemment. L'éluat obtenu, examiné sur chromatogramme révélé, présente deux taches distinctes l'une correspondant à la spartéine, et l'autre à P2.

Purification.

Les éluats réunis sont concentrés sous pression réduite jusqu'à obtention d'un volume final de 2 à 3 ml. Chromatographiés en présence de deux bandes témoins placées aux deux extrémités de la feuille, la solution concentrée donne toujours deux taches. La bande de P2 est coupée, puis éluée avec de l'éthanol. L'opération est répétée deux fois et après le second traitement, l'éluat ne donne qu'une seule tache (Rf 0,59).

Etude spectrale de la solution.

La solution éthanolique filtrée pour se débarrasser des petits fragments de papier est passée au spectrophotomètre LERES « Spila ». L'absorption ultra-violet présente : (fig. N° 6)

— 3 maximums à 209 $m\mu$
 228 $m\mu$
 277 $m\mu$

— 2 minimums à 217 $m\mu$
 264 $m\mu$

L'éluat est concentré et additionné d'une solution d'acide picrique à saturation dans le méthanol ; aucun précipité ne se forme en raison, sans doute, de la faible teneur en alcaloïde.

Discussion des résultats.

La figure n° 6 indique le spectre d'absorption dans l'ultra-violet de l'alcaloïde P2 ; sur le même graphique nous avons fait figurer également les spectres de la cytisine et de la spartéine. Il apparaît que la substance P2 diffère notablement de la spartéine mais présente un point commun de constitution avec la cytisine, par un

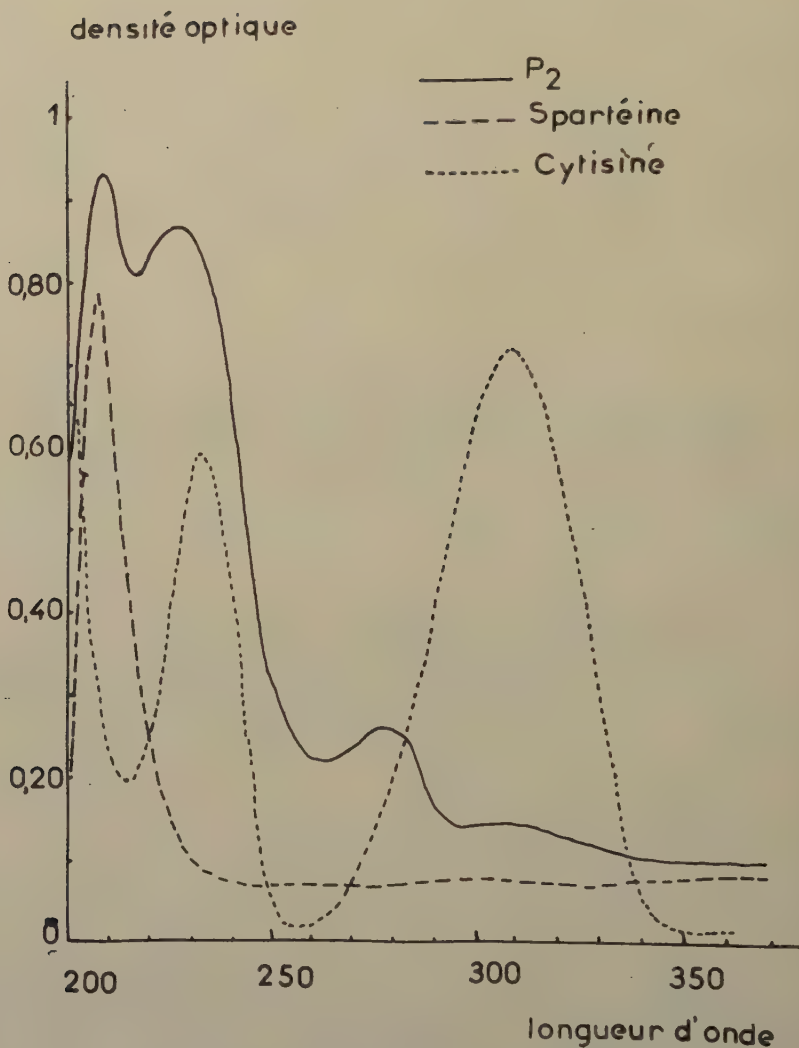
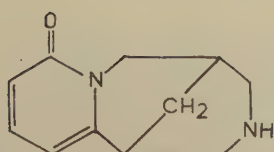
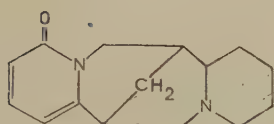


Fig. N° 6
Spectres ultra-violets de cytosine, spartéine et P2

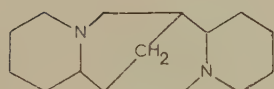
maximum d'absorption à 288 m μ ; ce qui ferait penser à la possibilité d'un cycle non saturé ou porteur d'une fonction quinone comme la cytosine ou l'anagrine qui présentent tous deux le même spectre d'absorption.



Cytisine



Anagryne



Spartéine

Toutefois, il serait nécessaire de séparer une quantité importante de cet alcaloïde pour pouvoir confirmer cette hypothèse.

*
**

En conclusion nous avons retrouvé, comme MARION et OUELLET, 4 alcaloïdes dans **Baptisia australis** R. Br. Cependant, les résultats obtenus diffèrent de ceux des canadiens par le fait que la cytisine se trouve en quantité supérieure à la N-méthyl cytisine.

II. — ACIDES AMINES

(Technique d'extraction, Séparation, Caractérisation)

— Technique d'extraction.

Le matériel végétal (racine, feuille) est fixé dans l'alcool bouillant pendant 20 minutes, puis broyé. Le broyat est successivement épuisé à chaud par de l'éthanol à 80 C, ensuite par de l'éthanol à 50° et à la fin par de l'eau distillée. Les liqueurs d'extraction sont réunies puis filtrées. Le filtrat sera traité par des résines échangeuses d'ions.

— Séparation.

a) Régénération de la résine : la résine employée est de type polystyrène sulfoné, la Permutite C 50 D (Philips et Pain), 20-50 mesh. La résine est régénérée par de l'acide chlorhydrique normal et lavée à l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de lavage ait un pH égal ou supérieur à 5,4.

b) Séparation proprement dite : les extraits hydro-alcooliques sont traités sur Permutite C 50 D placée dans une colonne à chromatographie. Le débit est réglé de façon à recueillir de 20 à 30 gouttes d'effluent à la minute. Après le lavage à l'eau distillée, la colonne est soumise à l'élution par une solution d'ammoniaque normale (une solution au 1/10 d'ammoniaque commerciale correspond à peu près à la normalité). La fin de l'élution est facilement repérée grâce à la présence des composés flavonoïdes qui restent fixés sur la résine et ne sont pas complètement éliminés par le lavage de celle-ci après passage de l'extrait ; ces composés jouent un rôle de réactif indicateur : l'éluat présente une fluorescence jaune verdâtre lorsqu'il devient alcalin, c'est-à-dire la résine saturée d'ions NH_4^+ , en fin d'élution.

— Caractérisation.

L'éluat ammoniacal est concentré, à sec sous pression réduite ; le résidu est repris par une quantité d'eau ou d'alcool à 50° égale en volume au poids de substance fraîche qui a servi de prise d'essai. Cette solution est analysée par chromatographie de partage sur papier :

a) Papier : « Arches 302 » ; ce papier donne de bons résultats si l'on a soin de respecter toujours les mêmes sens de texture du papier avec les différents solvants.

b) Solvants : Premier solvant : Butanol-acide formique-eau : 75-15-10 ; deuxième solvant : Phénol-eau : 80-20.

Le premier solvant est préparé extemporanément par mélange du butanol (75 vol.) et d'une solution d'acide formique à 60 % dans l'eau distillée (25 vol.) ; la phase vapeur dans la cuve à chromatographie correspond à la tension de vapeur, dans les conditions de développement, d'une solution aqueuse à saturation de la phase solvante.

Le deuxième solvant doit être préparé souvent en petite quantité pour éviter l'oxydation de la solution phénolique ; le phénol distillé à 181-182° C, au distillat encore chaud on ajoute 25 % d'eau distillée ; le phénol aqueux absolument incolore est conservé en flacons bruns, bouchés à l'émeri, à l'abri de la lumière.

c) Chromatographie : nous avons choisi la chromatographie descendante en cuve Shandon à une température constante.

Le passage du premier solvant dure une quinzaine d'heures (pendant la journée) et 15 à 18 heures (une nuit) pour le solvant phénolique.

Après le passage du premier solvant l'évaporation du butanol, la feuille est découpée parallèlement au front de ce solvant à quelques centimètres au-dessus de celui-ci, ceci afin de permettre une descente régulière du deuxième solvant. Au cours de la deuxième opération le solvant phénol descendra parallèlement au front butanolique ; l'accumulation d'éléments minéraux au niveau de ce front provoque à cet endroit un ralentissement de la migration du phénol de telle sorte que le front phénolique n'est pas rectiligne mais courbe avec une pointe très marquée au niveau du front du premier solvant. L'identification des aminoacides à R_f élevé dans les deux solvants serait ainsi rendue beaucoup plus délicate (leucine et isoleucine par exemple).

Avant de découper la zone frontale, il est bon de mesurer la première distance frontale et de s'assurer de l'absence de spots dans la partie éliminée.

Le chromatogramme développé est séché dans un courant d'air chaud à 24-30° C.

d) Révélation des chromatogrammes : les chromatogrammes sont immergés dans une solution acétonique de ninhydrine à 0,2 % légèrement acidifiée par l'acide acétique (0,5 ml pour 100).

Pour une caractérisation rapide la révélation se fait à la température de 60 à 70° C ; cette méthode est générale, elle révèle la plupart des acides aminés en bleu violacé à l'exception de quelques uns tels la proline (jaune), l'hydroxyproline (jaune-orangé), la Cystéine et le glutathion (brun rosâtre) la lysine (gris), la phénylalanine (bleu) et l'asparagine (brun-gris).

Pour une caractérisation plus spécifique nous avons fait appel aux réactifs suivants :

— Isatine en solution à 0,2 % dans l'éthanol ou le butanol légèrement acidifié par l'acide acétique (4 %) ; révélation en 24 h. à la température du laboratoire ou 1/2 h. à 70° C. La proline donne une coloration bleue et l'hydroxyproline une coloration bleu pâle.

— Réaction de SAKAGUCHI adaptée par ACHER et CROCKER (1) à la révélation de l'arginine et des composés guanidiques sur un chromatogramme. Le réactif est composé de deux solutions :

— Solution I : α -naphtol en solution alcoolique à 0,01 %.

Urée en solution alcoolique à 5 %.

— Solution II : solution d'hypobromite de sodium (2 g de brome pour 100 ml de soude à 5 %).

La pulvérisation de la deuxième solution après séchage de la première fait apparaître une coloration rouge en présence de l'arginine.

— α -nitrosol- β -naphtol : après pulvérisation d'une solution éthanolique d' α -nitrosol β -naphtol (0,1 %) et séchage, une deuxième pulvérisation d'acide nitrique à 10 % suivi d'un chauffage de 3 minutes à 90° C fait apparaître une coloration rouge en présence de la tyrosine.

— Dialdéhyde O-phthalique, en solution dans l'acétone (2 %). Le chromatogramme immergé dans cette solution fraîchement préparée, séché et chauffé 10 minutes à 50° C, le glyocolle présente une tache verte, l'histidine et le tryptophane présentent des taches jaunes.

— Détermination des acides aminés : certains spots sont aisément déterminés par leurs réactions colorées, leur Rf ou par comparaison avec chromatogramme témoin. Pour faciliter ces comparaisons les chromatogrammes sont reproduits sur papier calque et les valeurs des Rf représentées par des droites en quadrillage. En cas de doute quant à la caractérisation d'un des acides, l'addition sur le dépôt de l'échantillon analysé de l'acide permettra de définir l'identité de celui-ci avec le témoin.

LISTE DES ACIDES AMINÉS DES FEUILLES ET RACINES DE BAPTISIA AUSTRALIS R. Br.

Les acides aminés sont numérotés de 1 à 18 ; ces numéros correspondent à ceux des chromatogrammes (Figure N° 7 et 8).

En dehors de ces taches connues, certains spots n'ont pas été identifiés ; nous les désignons par des lettres a, b, c et d.

N°	Nom	Feuille	Racine
1	Glycocolle	+	+
2	Alanine	+++	+++
3	Valine	++	+
4	Sérine	+++	++
5	Thréonine	+	+
6	Acide aspartique	++	++
7	Acide glutamique	++	+++
8	Asparagine	+++	+++
9	Glutamine	+	++
10	Acide γ -amino-butyrique	+++	0
11	Arginine	0	+++
12	Proline	+++	+++
13	Tyrosine	0	+
14	Cystine	0	+
15	a	+	+
16	b	0	+
17	c	+	+
18	d	+	0

*
**

Nous avons trouvé à peu près les mêmes acides aminés libres dans les feuilles et les racines de **Baptisia australis** R. Br., à l'exception de l'arginine, la tyrosine, la cystine et b qui sont absents des feuilles et l'acide γ -amino-butyrique et d des racines.

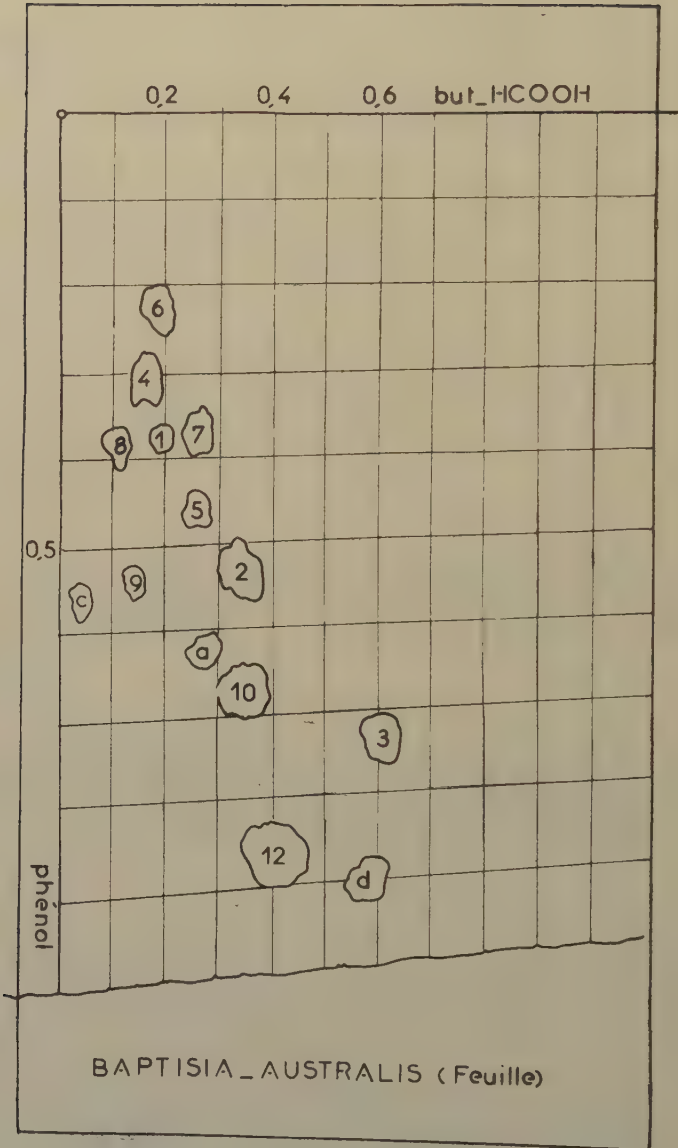


Fig. No 7

Acides aminés de feuille de *Baptisia australis* R. Br

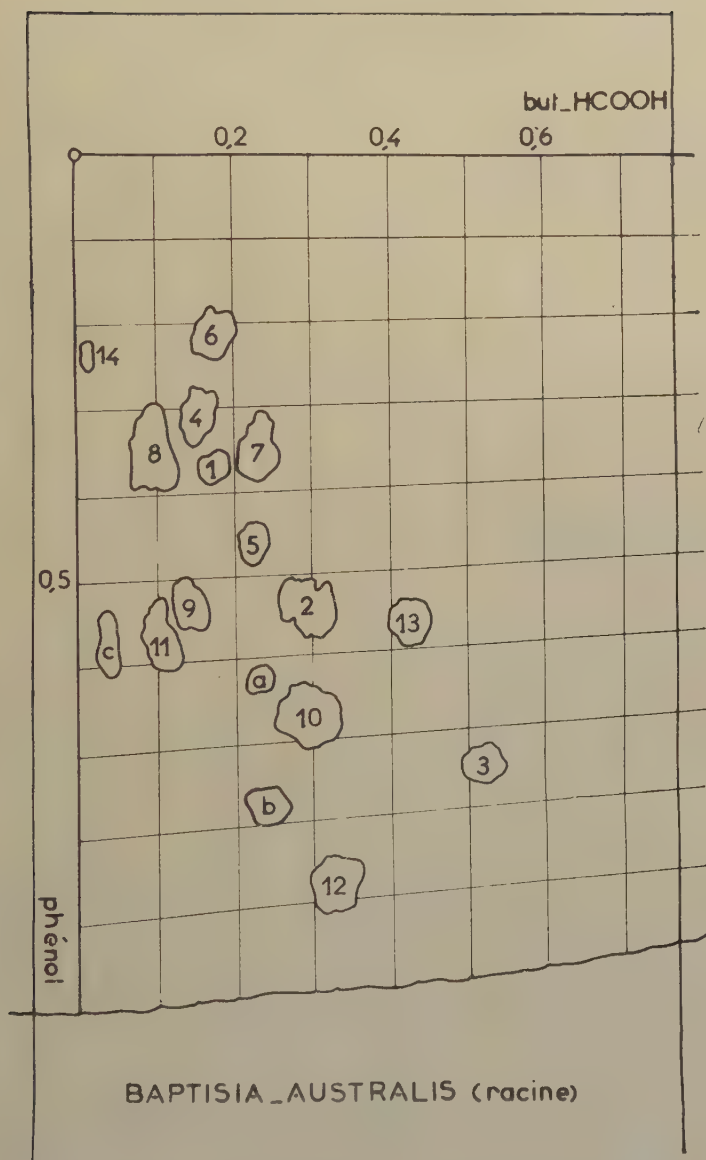


Fig. N° 8

Acides aminés de racine de *Baptisia australis*

CHAPITRE III

SUBSTANCES POLYPHENOLIQUES

TRAVAUX PERSONNELS

I) Etude de dérivés flavoniques dans les feuilles.

Dans les essais préliminaires conduits sur les feuilles, nous avons mentionné, outre les alcaloïdes, la présence de deux taches : l'une (mineure) à Rf 0,65 et l'autre (bien plus importante) à Rf 0,45 (solvant de Partridge). Ces 2 taches donnent des réactions caractéristiques des flavones.

EXTRACTION DES FLAVONES

Les feuilles fraîches de *Baptisia australis* R. Br., cueillies au mois de septembre 1963 sont stabilisées par traitement à l'éthanol bouillant sous réfrigérant à reflux. De ces feuilles stabilisées, une partie est utilisée immédiatement pour les essais préliminaires et l'autre partie est conservée en chambre froide. C'est sur la partie conservée qu'a été effectuée l'extraction des dérivés flavoniques.

Les feuilles stabilisées (500 g) sont séchées puis épuisées par le même solvant ayant servi à la stabilisation. Les colatures sont concentrées sous pression réduite jusqu'à élimination totale de l'alcool. Le résidu obtenu, de couleur brune, est repris par l'eau chaude, filtré à chaud et ensuite dégraissé à l'éther. Le filtrat obtenu est placé en chambre froide (47).

Après quatre jours de séjour en chambre froide, nous avons observé l'apparition des premiers cristaux. Ceux-ci ne sont pas recueillis immédiatement, mais seulement toutes les semaines, où nous avons effectué l'opération suivante : les précipités sont recueillis par centrifugation ; le liquide surnageant est remis en chambre froide et le précipité obtenu est lavé à plusieurs reprises par de l'eau distillée.

La précipitation est terminée au bout de 4 semaines. Le précipité obtenu est de 0,797 g pour 500 g de feuille, ce qui fait un taux minimal de 0,16 % de dérivés flavoniques.

Le précipité recueilli, de couleur jaune, présente une réaction positive au test de la cyanidine. Il est souillé d'impuretés diverses. La chromatographie sur papier révèle la présence de quatre taches dont 2 seulement sont des flavones.

FRACTIONNEMENT ET PURIFICATION.

a) Fractionnement sur colonne de silice : cette méthode n'a pas permis de séparer les dérivés flavoniques mais seulement de les purifier en partie. Le résultat est confirmé par l'examen chromatographique sur papier des éluats.

b) Cristallisation fractionnée : le produit est dissous dans l'éthanol à 80° bouillant. La solution éthanolique est ensuite évaporée jusqu'à l'apparition d'un léger trouble. On laisse refroidir la solution et l'on place 24 h. en chambre froide. Le précipité formé est recueilli par centrifugation et mis à sécher sous vide phosphorique. En chromatographie sur papier, nous avons observé la disparition plus ou moins partielle des taches parasites ; la tache flavonoïde (Rf 0,65) persiste encore sous forme de trace mais disparaît après un second traitement. Celui-ci donne un précipité jaune ayant une pureté convenable, confirmée par chromatographie sur papier.

ETUDE DU FLAVONOÏDE PRINCIPAL.

I. — Propriétés physiques

C'est une poudre jaune constituée de fines aiguilles ; elle ne possède ni odeur ni saveur.

— **Point de fusion** : le point de fusion a été déterminé selon les techniques suivantes, sur un produit cristallisé successivement dans l'éthanol à 50°, l'eau, l'éthanol à 96°.

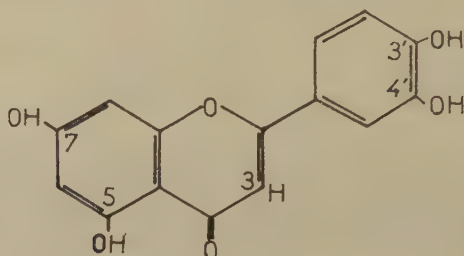
a) le point de fusion instantané (banc chauffant) est égal à 270° C environ.

b) au microscope à platine chauffante, le point de fusion est de l'ordre de 240° C.

— **Solubilité** : insoluble dans l'éther de pétrole, l'éther éthylique, peu soluble dans l'acétate d'éthyle et l'acétone, assez soluble

dans l'éthanol, très soluble dans les solutions alcalines et dans l'eau chaude.

— **Spectre ultra-violet** : le spectre d'absorption dans l'ultra-violet du produit dissous dans l'éthanol à 95° est très voisin de celui de la lutéoline. (Appareil U.V. 137 Perkin-Elmer).



Il présente :

— 2 maximums à 257 m μ , avec un épaulement à 264-269 m μ , et à 354 m μ .

— 2 minimums à 237 m μ et 300 m μ .

— **Spectre d'infra-rouge** : le spectre d'absorption dans l'infra-rouge du produit solide pastillé dans le bromure de potassium (Infracord Perkin-Elmer) présente les caractéristiques suivantes (36) :

— 3,01 μ ou 3320 cm⁻¹ = bande des OH libres (sucre notamment et phényle latéral).

— 6,06 μ ou 1650 cm⁻¹ = bande des carbonyles chélatés par un hydroxyle en 5.

— 6,27 μ ou 1595 cm⁻¹ = bande des phényles.

— 6,72 μ ou 1488 cm⁻¹ = bande des phényles.

— 6,96 μ ou 1437 cm⁻¹ = bande aromatique ?

— 7,32 μ ou 1366 cm⁻¹ = OH phénoliques.

— 7,96 μ ou 1256 cm⁻¹ = bande du groupement éther-oxyde

— 8,49 μ ou 1178 cm⁻¹ = 2ème bande OH phénolique ?

— 11,87 μ ou 842 cm⁻¹ = hydrogènes aromatiques isolés.

— **Pouvoir rotatoire.**

α = — 81° (déterminé sur une solution à 0,78 % dans l'éthanol à 80° et pour la raie jaune du sodium).

II. — Propriétés chimiques.

— Réactions colorées :

— action de l'acide chlorhydrique et du magnésium ou réaction dite de la cyanidine : la coloration obtenue est de coloration rose ou franchement rouge.

— Coloration en milieu alcalin : il se dissout en jaune intense dans les liqueurs alcalines.

— avec le perchlorure de fer, il donne une coloration vert-olive.

— l'acétate basique de plomb provoque une coloration jaune et une précipitation.

— le réactif citro-borique de Wilson (10) donne une coloration jaune et une fluorescence jaune vif en lumière ultra-violette.

— le trichlorure d'aluminium en solution alcoolique donne une coloration jaune-vert et une fluorescence jaune vif.

— la solution chloroformique de chlorure d'antimoine développe avec une solution du flavonoïde une coloration jaune intense.

— Essai d'hydrolyse.

Il est facilement hydrolysé par les acides minéraux qui libèrent une génine et un sucre réducteur.

L'acide chlorhydrique 2 N au bain-marie bouillant pendant quarante minutes, provoque une hydrolyse apparemment complète. La chromatographie confirme ce résultat. Ce flavonoïde présente toutes les propriétés générales d'un hétéroside flavonique.

III. — Etude de la génine.

a) **Isolement** : quelques mg de flavonoïde sont traités par HCl 2N au bain-marie bouillant pendant 40 minutes. On laisse refroidir le mélange. On extrait la génine par l'éther.

b) **Propriétés** : la solution éthanolique de la génine est colorée en rouge par action du magnésium en milieu chlorhydrique et en brun-vert par le perchlorure de fer.

Elle est insoluble dans l'eau à froid et à chaud, soluble dans l'éther, l'acétone, l'acétate d'éthyle, très soluble dans l'éthanol, le méthanol et les solutions alcalines.

Par chromatographie sur papier (solvant de Partridge) son R_f est de 0,85 ; il en est de même pour la substance témoin fournie par CHOPIN (*).

Son spectre ultra-violet présente les caractéristiques suivantes :

- 2 maximums :
 - Bande I 353 $m\mu$ avec une inflexion à 268 $m\mu$
 - Bande II 257 $m\mu$
- 2 minimums : à 285 $m\mu$ et 236 $m\mu$.

Action de différents réactifs sur le spectre ultra-violet de la génine :

— Chlorure d'aluminium (27) : le chlorure d'aluminium en solution éthanolique saturée forme un complexe avec les composés ayant un hydroxyle en 5 ou en 3, en provoquant un dédoublement du spectre initial avec un effet bathochrome. En ajoutant cette solution à celle de la génine, l'effet bathochrome entre I et Ia est de l'ordre de 40 $m\mu$; ce qui montre que l'OH en 5 est libre.

Le déplacement serait de l'ordre de + 60 $m\mu$ s'il s'agissait d'un flavonol (hydroxyle libre en 3).

- Bande Ia λ max..... 391 $m\mu$
- Bande Ib λ max..... 358 $m\mu$
- Bande IIa λ max..... 274 $m\mu$
- Bande IIb λ max..... 262 $m\mu$

— Acétate de sodium (28) : l'acétate de sodium ionise les hydroxyles les plus fortement acides, c'est-à-dire en 7 et en 4', en provoquant un effet bathochrome. En ajoutant un peu d'acétate de sodium à la solution éthanolique de génine, on observe :

— sur la bande I un déplacement de plus de 31 $m\mu$; l'hydroxyle en 4' est donc libre ;

— sur la bande II un déplacement de 11 $m\mu$; l'hydroxyle en 7 est donc libre.

La lutéoline témoin sous l'influence de ces mêmes réactifs subit les mêmes modifications. On peut conclure que la génine des feuilles de **Baptisia australis** R. Br, par ses propriétés physico-chimiques, est identique à la lutéoline témoin.

(*) Nous remercions vivement le Professeur CHOPIN (J.) pour cet échantillon.

IV. — ETUDE DES SUCRES

La recherche des sucres a été faite sur la liqueur provenant de l'hydrolyse. L'hydrolysate est neutralisé par passage sur permutite A 300 D et concentré à 2 ou 3 ml. Cette solution qui réduit la liqueur de Fehling, est destinée à l'identification des sucres par chromatographie. Les chromatographies sur papier Arches 302 ont été réalisées en présence des sucres témoins dans deux séries de solvants. Les taches ont été révélées par le phtalate d'aniline. Les Rf du sucre à étudier et ses réactions colorées sont celles du glucose.

Solvants	Rf
Solvant de Partridge	0,20
Phénol-eau	0,35

Comme le glucose et le galactose ont des Rf voisins, nous avons superposé sur la ligne de départ les taches du sucre à étudier à celle du glucose témoin d'une part et à celle du galactose d'autre part. Le chromatogramme obtenu avec les deux solvants cités montre un dédoublement de la tache du galactose et du sucre inconnu et une tache unique pour le mélange sucre inconnu et glucose.

L'ose séparé est du glucose.

V. — DETERMINATION DE LA STRUCTURE DU FLAVONOÏDE

a) **Position du sucre** : nous avons signalé dans l'étude du flavonoïde (propriétés physiques) l'analogie du spectre ultra-violet du flavonoïde et de son aglycone (lutéoline). Comme la fixation d'un groupement méthyle ou d'un ose sur l'OH en 7 ne change pas d'une façon appréciable le spectre ultra-violet d'une hydroxyflavone (29), il est probable qu'il s'agisse d'un hétéroside en position 7 ; les résultats ci-dessous le confirment :

— **Chlorure d'aluminium** : l'addition d'une solution alcoolique de chlorure d'aluminium à la solution éthanolique du flavonoïde provoque un dédoublement de la bande I de l'hétéroside qui montre deux maximums à 357 m μ et 395 m μ et un déplacement bathochrome de 41 m μ . La glucosyl-5 lutéoline est donc exclue.

— **Acétate de sodium** : en ajoutant de l'acétate de sodium, un effet bathochrome se manifeste sur la bande I qui se déplace de

353 m μ à 413 m μ tandis que la bande II reste en place ; ceci montre que le groupement OH en 4' est libre, tandis que l'OH en 7 est bloqué.

— **Ethylate de sodium** : (30) plus alcalin que l'acétate de sodium, l'éthylate de sodium ionise tous les groupements OH quelle que soit leur position ; les bandes I et II présentent toutes les deux un déplacement bathochrome ; leur stabilité montre l'absence d'OH libres en 3 et 4' simultanément

— **Acétate de sodium et acide borique** : l'acide borique en présence de l'acétate de sodium forme des chélates avec les composés possédant des groupements dihydroxylés. Il s'ensuit un déplacement bathochrome de la bande I de 15 à 20 m μ par rapport à l'alcool pur (31). Ce réactif en contact avec la solution flavonique provoque un effet bathochrome de 32 m μ sur la bande I ; des groupements O-dihydroxylés sont libres ; ce sont ceux en 3' et 4'.

Les groupements OH en 5', 3', 4' étant libres la liaison osidique s'effectue obligatoirement sur l'OH en 7 de la lutéoline. Il s'agit donc d'un 7-glucoside de la lutéoline.

b) Détermination du nombre de molécules de sucre.

L'hydrolyse de 5 mg de glucoside-7 de la lutéoline libère 2,90 mg de lutéoline soit 58 % d'aglycone (dosage spectrophotométrique à 353 m μ). Théorie : 61 % pour un monoglucoside et 44 % pour un diglucoside dihydraté.

Il s'agit donc d'un monoglucoside de la lutéoline.

c) Détermination du mode de liaison du monoglucoside-7 de la lutéoline.

10 mg de glucoside-7 de la lutéoline sont dissous dans 50 cm³ de tampon citrate - phosphate à pH 5. Le tout est porté à 40° C au bain-marie pour faciliter la dissolution du produit. Après quelques minutes de refroidissement on ajoute 20 mg de β glucosidase puis on laisse à l'étuve à 35° C pendant une nuit (15 h.). (la glucosidase employée N.B.C. libère 3 μ g de glucose par minute). Après ce laps de temps, l'extraction par l'éther et la chromatographie sur papier révèlent une tache importante de lutéoline.

Il s'agit donc d'un monoglucoside 7 - β - de la lutéoline.

VI. — DISCUSSION DES RESULTATS

En 1936, NAKAMURA, OHTA et HUKUTI (45) isolèrent des feuilles de **Digitalis purpurea** L. une substance dont l'hydrolyse fournit une molécule de D-glucose et une lutéoline. La méthylation et l'hydrolyse ont montré que le glucose était fixé en 7.

Ce même glucoside a été ensuite isolé de **Sophora angustifolia** (22), des fleurs de **Coreopsis maritima** (16), du **Reseda luteola** (13) (46) et tout récemment de **Hieracium pilosella** L. (20).

En 1960, TEOULE, CHOPIN et MENTZER (58) ont obtenu par synthèse un 7 - β - glucoside de la lutéoline. C'est en effet sur cet échantillon qu'ont été effectuées toutes nos recherches comparatives et la similitude des spectres infra-rouge confirme la structure de notre produit.

Remarquées par CHOPIN et LEBRETON, signalées par Mme HAAG-BERRURIER (20) dans sa thèse, des anomalies spectrales I.R. existent entre les différents 7 - β - glucosides de la lutéoline connus. Mme HAAG - BERRURIER a fait une étude comparative entre son produit et un lutéoloside de R. PARIS ; nous avons à notre disposition six spectres I.R. du produit provenant de R. PARIS, HATTORI, HORHAMMER (24), TEOULE et HAAG - BERRURIER et celui du **Baptisia australis** R. Br, quatre ont été étudiés au point de vue spectre I.R. par le même appareil. (PARIS, HATTORI, TEOULE, notre flavonoïde)

En se basant sur les spectres I.R. de ces différents produits, 2 types de spectres sont à souligner :

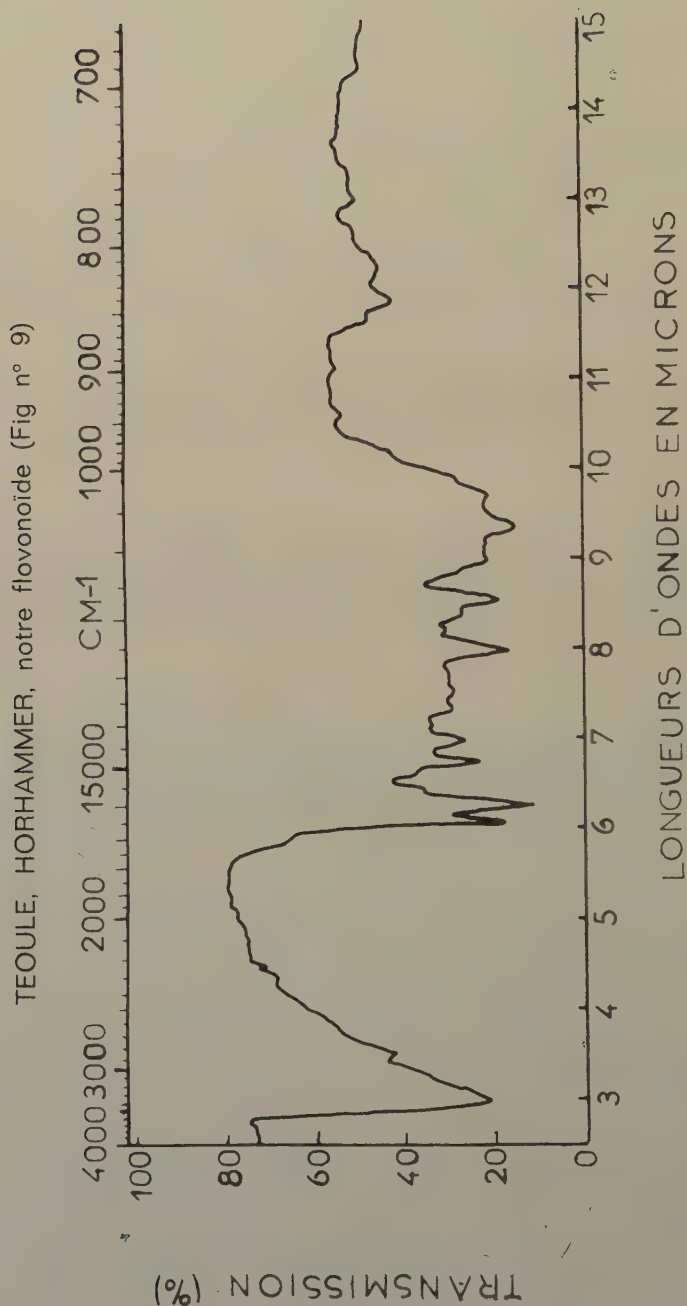


Fig. N° 9

Spectre infra-rouge du 7 β - glucoside de la lutéoline (Forme I)

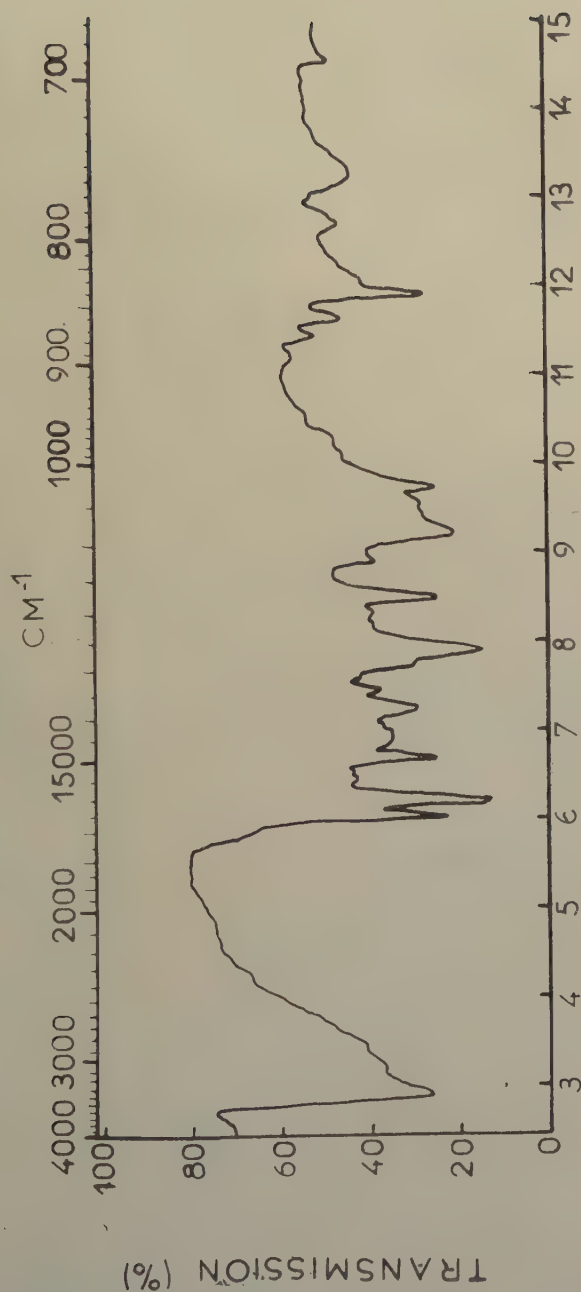


Fig. N° 10

Spectre infra-rouge du 7 β glucoside de la lutéoline (Forme II)

Les différences peuvent paraître minimes, voir même négligeables si nous ne disposons que d'un exemple de chaque spectre. Mais étant donné qu'elles sont reproductibles 3 à 3, nous devons admettre leur validité. Les fréquences des mêmes bandes sont régulièrement plus basses dans I que dans II (comparaison entre notre flavonoïde et celui de HATTORI ; il ne s'agit pas d'un décalage de l'appareil car les figures ont été ici corrigées par rapport à une substance étalon). Les plus nettes différences se situent dans la région 9-10 μ soit 1000 cm^{-1} et 1100 cm^{-1} .

Dernièrement nous avons réussi le passage de la forme I à la forme II par traitement thermique bref à 200-250° C. Le produit obtenu après traitement présente exactement le même spectre I.R. que celui de la forme II.

VII. — CONCLUSION

Il s'agit en fait du même produit ; le problème est de savoir si ces différences sont d'ordre physique (systèmes cristallins) ou chimique (structure du reste glucose). Des recherches se poursuivent sur ce sujet.

II. — ETUDE DE DEUX DERIVES DE TYPE ISOFLAVONIQUE DANS LES RACINES

La présence d'autres taches sur le chromatogramme d'une teinture de racine au 1/5, en plus des taches alcaloïdiques, nous incite à penser à l'existence d'autres substances polyphénoliques que la glucosyl-7-lutéoline.

Extraction.

Elle se fait de la même façon que pour les flavones mais le filtrat destiné à la récolte de ces substances est placé sous une couche d'éther.

Après un séjour d'une semaine en chambre froide, nous avons récolté par centrifugation des poudres fines de couleur brun clair. Lavé à l'eau puis à l'alcool le produit est séché sous vide phosphorique dans un dessiccateur. L'examen chromatographique sur papier révèle deux ou trois taches.

Le filtrat aqueux remis en chambre froide fournit quelques jours après un 2^e précipité assez important composé de 2 sortes de cristallisations. Les unes se présentent en poudre fine (micro-cristaux), les autres en boules (oursins). Après séparation de ces 2 formes cristallines à la pince, l'examen en chromatographie sur papier donne des taches de Rf suivants :

	Solvants	Rf	U.V.
Micro-cristaux	Partridge	0,69	Grisâtre
	A. acétique (60 %)	0,83	Bleu clair
« oursins »	Partridge	0,75	Jaune clair
	A. acétique (60 %)	0,87	Violet

Etude du produit précipité à l'état de micro-cristaux

— Propriétés physiques

C'est une poudre fine brun clair, sans saveur ni odeur.

Peu soluble dans l'eau, elle est très soluble dans le méthanol et l'éthanol.

Le spectre d'absorption dans l'ultra-violet du produit en solution dans l'éthanol à 95° est du type isoflavonique (26). Il présente :

- un maximum à 262 $m\mu$
- un épaulement vers 300 $m\mu$
- un minimum à 240 $m\mu$

Le spectre d'absorption dans l'infra-rouge d'un échantillon pastillé dans le bromure de potassium montre entre autres à :

- 2,90 μ ou 3350 cm^{-1} = bande des hydroxyles libres.
- 5,75 μ ou 1630 cm^{-1} = bande des carbonyles fortement liés ou conjugués.

— Propriétés chimiques.

a) **Nature du sucre** : la chromatographie sur papier du sucre libéré au cours de l'hydrolyse, dans deux systèmes de solvants différents et en présence de composés témoins, nous renseigne sur l'identité du sucre : il s'agit du glucose.

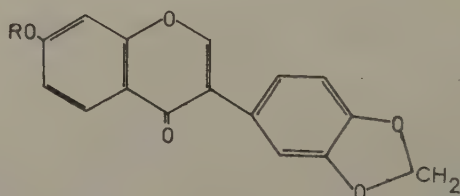
b) **Position du sucre** :

— le chlorure d'aluminium ne provoque pas de modifications du spectre initial ; il n'y a donc pas d'OH en 5 dans notre isoflavone

— l'acétate de sodium et l'acide borique donnent de même un spectre inchangé ; il semble ne pas y avoir d'hydroxyles phénoliques libres.

— Discussion des résultats.

Les caractéristiques données ci-dessus sont en faveur de l'analogie avec un hétéroside d'isoflavone déjà rencontré dans les racines de **Baptisia tinctoria R. Br** : la pseudo-baptisine. Cette substance a été isolée par GORTER (18) et SPATH et SCHMIDT (56) et l'aglycone (pseudo-baptigénine) a été synthétisé par MAHAL, RAI, VENKATARAMAN (37) et BAKER, CHADERTON et OLLIS (4).



R = H, pseudo-baptigénine (fig. 1).

R = Rhamno-glucosyl, pseudo-baptisine.

Le spectre ultraviolet de notre produit est voisin de celui donné pour la pseudo-baptisine ; deux points sont toutefois à mentionner :

— l'éthylate de sodium provoque sur le spectre ultra-violet un déplacement hypsochrome de la bande principale de - 12 m μ alors que la structure proposée n'a pas d'hydroxyle phénolique libre.

— l'hydrolyse acide ne provoque pas la libération de rhamnose.

Des recherches se poursuivent pour confirmer notre hypothèse d'un glucoside en 7 de la pseudo-baptigénine.

Etude du produit cristallisant en « oursins ».

— Propriétés physiques.

Il se présente en aiguilles assemblées le plus souvent en « oursins ».

Le spectre d'absorption dans l'ultra-violet de la substance en solution dans l'éthanol présente (Fig n° 11) :

- un maximum principal à 311 m μ
- deux ressauts à 280 et 286 m μ
- un minimum à 259 m μ

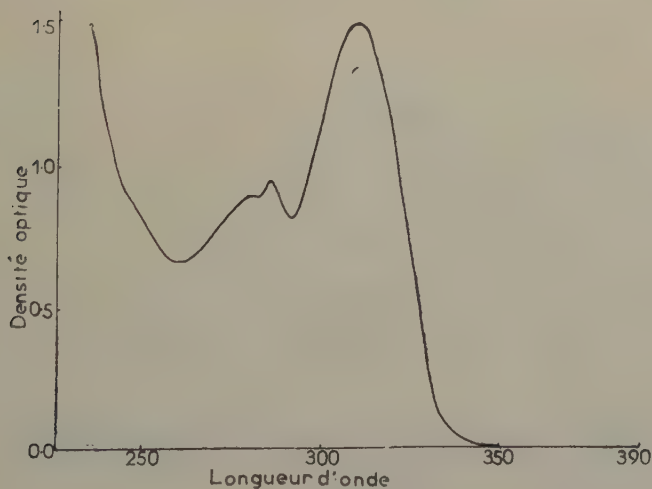
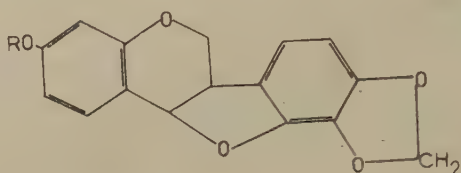


Fig. N° 11

Spectre ultra-violet du produit cristallisant en « oursins »

Or un spectre absolument semblable est donné par SON. BRENDENBERG et HIETALA (53) pour des isoflavones complexes la ptérocarpine et la trifolirhizine.



R = CH₃, ptérocarpine

R = glucosyl, trifolirhizine.

On notera d'ailleurs que ces deux produits ont été isolés par KING, COTTERIL, GODSON, JURD et KING (32) et AKISANYA, BEVAN et HIRST (2) des bois du genre **Pterocarpus** et du **Trifolium pratense** L. (53) ; en particulier la trifolirhizine a été trouvée dans les racines du trèfle, comme notre produit l'a été dans les racines de **Baptisia australis** R. Br. De plus on remarque les profondes analogies de structure qui existent entre la pseudo-baptigénine et la trifolirhizine.

D'autres arguments plus directs peuvent d'ailleurs être apportés en faveur de l'identité de notre substance et d'un composé de type trifolirhizine :

— le spectre U.V. ne subit aucune modification en présence de chlorure d'aluminium (absence d'hydroxyle en 5), d'acétate de sodium (absence d'hydroxyle libre en 7 et 4') d'acide borique (absence de groupements phénoliques libres en ortho). Le spectre reste d'ailleurs inchangé en présence d'éthylate de sodium (pH9-10) ce qui confirme l'absence de tout hydroxyle phénolique libre.

— l'hydrolyse acide libère du glucose identifié par chromatographie sur papier. Une bande intense à 3350 cm⁻¹ dans le spectre I.R. est en faveur de l'existence d'hydroxyles alcooliques tels que ceux d'un sucre.

La faible quantité de substance disponible ne nous a pas permis de pousser plus avant la purification et son étude. Les recherches se poursuivront sur le sujet.

En résumé nous avons obtenu :

1) un 7 - β - glucoside de la lutéoline à partir des feuilles.

2) à partir des racines des dérivés de type isoflavonique et isoflavanonique. Cette obtention confirme à la fois la capacité biosynthétique du genre **Baptisia** et celle des Légumineuses.

Il est intéressant de souligner la présence de l'hétéroside d'isoflavanone, d'une part en raison de son analogie structurale avec la pseudo-baptisine déjà signalée dans le genre, d'autre part en raison du fait qu'il s'agit, à notre connaissance, de la seconde mention seulement d'un tel composé dans la nature.

TROISIEME PARTIE

ETUDE PHARMACOLOGIQUE

TRAVAUX ANTERIEURS

Nous n'avons trouvé que quelques références concernant l'emploi du **Baptisia** en thérapeutique homéopathique.

Seul **Baptisia tinctoria** R. Br a fait l'objet d'une étude et c'est dans New Remedies de HALLE que la pathogénésie a été instituée en utilisant la teinture de racine sèche comme remède des infections intestinales de forme typhique, qu'elles soient à bacille d'Eberth, à bacille para A, para B ou non.

Quant au **Baptisia australis**, on ne relève aucune préparation dans le catalogue de teintures homéopathiques et son emploi est totalement inconnu. La détermination de l'activité pharmacologique de la teinture s'avère donc difficile. Pour cela nous allons nous baser sur l'action pharmacologique de chaque constituant de la teinture.

Les composants essentiels de la teinture sont les alcaloïdes. Ils sont au nombre de 4 : cytisine, N-méthyl cytisine, d-spartéine et P2.

La cytisine a la même action pharmacologique que le groupe nicotine. A faible dose elle se traduit par une excitation et à forte dose provoque la nausée, convulsions et la mort survient par arrêt respiratoire. L'action nicotinique est due à la N-méthyl cytisine confirmée plus tard par SCOTT et CHEN qui ont signalé qu'elle est 4 fois plus toxique que la nicotine (50).

La spartéine est un tonicardiaque (42) ; elle a une action directe sur le muscle cardiaque qui consiste en un renforcement de la systole ; aux concentrations toxiques, elle arrête le ventricule en systole après une courte période d'élévation du tonus (7). Elle augmente toutes les chronaxies musculaires (40). Elle a une action curarisante sur les terminaisons nerveuses motrices et une action pa-

ralysante sur le système nerveux central, elle paralyse les ganglions parasympathiques (23) ; elle est dépourvue d'action directe sur les fibres musculaires striées, mais excite après une courte dépression le muscle lisse de l'intestin (21) (23) (39). Elle a une action excitatrice sur l'utérus. A forte dose par voie intraveineuse elle déprime les réflexes vasomoteurs du sinus carotidien (41). Elle a une action hémolytique sur les globules rouges (12) et une action protectrice contre le venin de Vipère et les toxines tétanique et diphtérique (6).

Le 4^e alcaloïde, P2, reste inconnu tant au point de vue chimique que pharmacologique.

TRAVAUX PERSONNELS

1) Toxicité aiguë chez la souris.

Elle a été déterminée sur la teinture de racine de **Baptisia australis** R. Br.

La teinture est évaporée sous pression réduite jusqu'à obtention d'un volume final équivalant au 1/10 du volume initial. Connaissant le taux d'alcaloïdes totaux des racines, nous avons ramené avec de l'eau distillée à un volume correspondant à une teneur en alcaloïdes totaux de 2 mg/ml.

Nous avons opéré sur 4 lots de souris d'un poids moyen de 25 g (± 2), auxquelles on injecte par voie intrapéritonéale des doses décroissantes de la solution.

Aux doses les plus fortes, léthales, l'intoxication aiguë se manifeste par une polypnée, des tremblements et des phénomènes convulsifs non caractéristiques. Les morts, quand elles se produisent, surviennent dans les 24 h. qui suivent l'injection.

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant :

Baptisia australis R.Br: extrait aqueux de la teinture titrant 2 mg/ml d'alc. totaux, éventuel- lement dilué. Doses injectées en alc. tot.		Nbre de souris par lot	Mortalité en 24 h.	Mortalité %
en mg/souris	en mg/kg			
1	40	4	4	100
0,5	20	15	13	87
0,25	10	9	1	11
0,125	5	9	0	0

Ils permettent d'établir la courbe de mortalité en échelle log-probits, d'où l'on déduit par voie statistique graphique (43), la dose léthale 50 de la préparation dans ces conditions expérimentales (*)

DL 50 = 14 mg/kg chez la souris par voie intrapéritonéale.

Ces résultats semblent en accord avec les données de la littérature ; selon les auteurs (57) la cytisine aurait un DL compris entre 3 et 37 mg/kg par voie sous-cutanée selon les espèces utilisées. Beaucoup moins toxique est la spartéine (MLD = 120 mg chez la souris par voie sous-cutanée) et l'on déduit que la toxicité de l'extrait de **Baptisia australis** R. Br doit être liée vraisemblablement à la teneur en cytisine.

II) Activités pharmacologiques.

a) Action sur le duodénum isolé de lapin.

Une anse duodénale (3 à 5 cm) est prélevée sur un lapin et montée dans un bac à organe isolé, rempli de solution de LOCKE-RINGER, aéré de façon permanente. Les contractions, transmises par un myographe, sont enregistrées sur un cylindre noirci suivant le procédé habituel. Après avoir attendu que les contractions aient pris un rythme régulier, l'addition de l'extrait aqueux de teinture provoque :

— à faible dose (10×10^{-3} g) une augmentation brève du tonus puis une chute lente accompagnée d'une diminution de l'amplitude du péristaltisme.

— à forte dose (10×10^{-1} g) l'arrêt du péristaltisme, sans modification significative du tonus.

b) **Action sur l'oreillette droite isolée de cobaye :** l'oreillette droite d'un cobaye tué par saignée est prélevée, puis fixée dans un bain-marie à 29° C rempli d'une solution de LOCKE-ALLES (**). Nous

(*) Il s'agit d'une technique classique et nous n'avons pas jugé utile de reproduire la courbe de mortalité tracée selon les données expérimentales.

(**) La composition de ce soluté est la suivante :

ClNa	9,00 g
ClK	0,42
Cl ₂ Ca, 2 H ₂ O	0,48
CO ₃ HNa	0,30
Dextrose	1,00
Eau distillée qsp	1000 g

avons attendu que le rythme de l'oreillette ait repris l'allure normale (une heure environ) pour additionner toutes les deux minutes dans le bain-marie de 100 ml, 0,2 ml. de l'extrait aqueux de teinture. Nous avons observé les phénomènes suivants :

— à la concentration de 4×10^{-6} g, pas de variation de fréquence mais une légère diminution de l'amplitude des contractions.

— à la concentration de 8×10^{-6} g, diminution de la fréquence et de l'amplitude.

— à la concentration de $4,5 \times 10^{-5}$, le cœur s'arrête très rapidement en diastole.

Les enregistrements sont représentés dans les figures n° 12 :

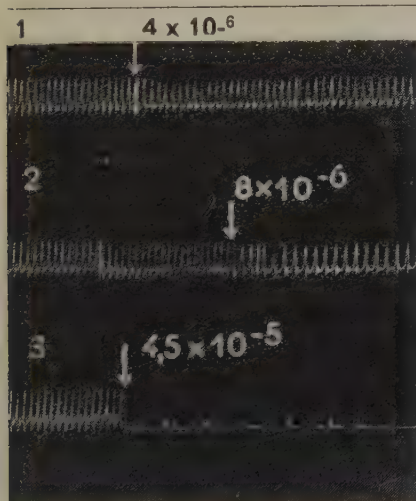


Fig. N° 12

Effets de l'extrait aqueux de *Baptisia australis* R. Br sur le rythme cardiaque (oreillette isolée de cobaye, concentration exprimée en alcaloïdes totaux)

1 - à la concentration de 4×10^{-6}

2 - à la concentration de 8×10^{-6}

3 - à la concentration de $4,5 \times 10^{-5}$

c) **Effets cardiovasculaires, in vivo, chez le lapin** de l'extrait aqueux de teinture : l'expérimentation se fait sur 9 lapins d'un poids de 2,150 kg à 3,500 kg. Six d'entre eux ont été anesthésiés au Nembutal par voie intraveineuse à la dose de 0,01 g par kg, les 3 autres n'ont fait l'objet d'aucune anesthésie.

Dans tous les cas, les animaux placés en decubitus dorsal, étaient trachéotomisés. La pression artérielle était enregistrée à partir d'une artère fémorale par la méthode manométrique. Un pneumographe de type Paul Bert permettait l'enregistrement de la ventilation.

Un cathéter intraveineux permettait l'injection de l'extrait aqueux de la teinture de racine à une vitesse et un délai variables au moyen d'une pompe à perfusion continue Braun.

L'électrocardiogramme était recueilli en D I et D III en utilisant un Praxigraph. II.

1. — Résultats.

Le rythme cardiaque n'a jamais été modifié, de même que les complexes ventriculaires, quelle que soit la dose injectée.

La pression artérielle a toujours baissé proportionnellement au débit de l'injection. L'hypotension apparaît pour une dose de 0,07 mg d'alcaloïdes totaux par minute et par kg corporel. Elle devient irréversible et la mort de l'animal se produit rapidement pour une dose d'environ 2 mg/kg/minute. Aux doses intermédiaires, l'hypotension est proportionnelle à celles-ci, se maintenant un certain temps après l'arrêt de la perfusion. La pression artérielle revient à sa valeur primitive après un délai de 10 à 15 minutes.

La ventilation n'a pas présenté de variations notables lors des hypotensions modérées chez l'animal anesthésié. Par contre, l'animal éveillé avait un rythme ventilatoire augmenté lors de l'hypotension, les valeurs extrêmes de celle-ci entraînent toutefois un ralentissement ventilatoire accompagné d'une agitation marquée de l'animal.

Certains enregistrements réalisés sont présentés dans les figures n° 13 - 14 - 15 - 16.

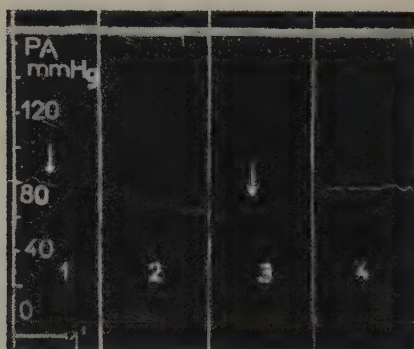


Fig. N° 13

Effets tensionnels de la Cytisine injectée par voie intraveineuse à la dose de 0,3 mg/min/kg.

- 1 - √ début de la perfusion
- 2 - Au cours de la perfusion
- 3 - √ Arrêt de la perfusion (5 minutes après la perfusion)
- 4 - Enregistrement 5 minutes après l'arrêt de la perfusion.

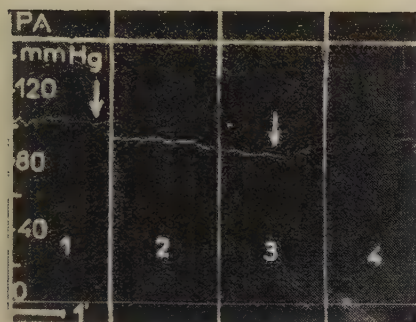


Fig. N° 14

Effets tensionnels de l'extrait aqueux de *Baptisia australis* R. Br perfusé à faible dose (1,15 mg/min/kg d'alcaloïdes totaux).

- 1 - Enregistrement témoin Ψ début de la perfusion.
- 2 - Après 3 minutes de perfusion.
- 3 - Ψ arrêt de la perfusion après 6 minutes.
- 4 - Enregistrement 3 minutes après l'arrêt de la perfusion.

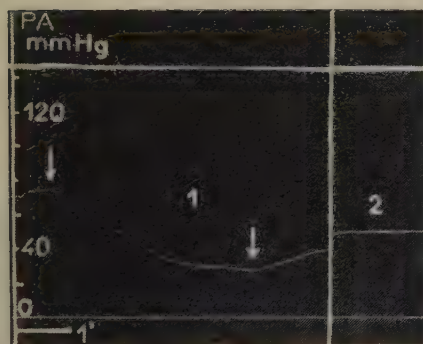


Fig. N° 15

Effets tensionnels de l'extrait aqueux de *Baptisia australis* R.Br perfusé à forte dose (2,25 mg/min/kg d'alcaloïdes totaux).

- 1 - Ψ Début et fin de la perfusion. Ψ
- 2 - Enregistrement 6 minutes après l'arrêt de la perfusion.

2. — Discussion.

La cytisine et la spartéine contenues dans l'extrait aqueux étudié sont connues habituellement pour leur action ganglioplégique.

L'hypotension observée pourrait vraisemblablement être attribuée à une telle action. Les modifications ventilatoires proviennent probablement des variations tensionnelles.

Il est frappant de remarquer l'absence de modification du rythme cardiaque alors que la spartéine pourrait être responsable d'une accélération. Des résultats obtenus par ailleurs (9) montrent que chez l'animal entier et non anesthésié la cytisine pure a une forte action bradycardisante s'exerçant par l'intermédiaire des nerfs vagues. Il est possible que ce phénomène soit empêché par la perfusion de spartéine que réalise l'injection de l'extrait aqueux de *Baptisia australis* R. Br.

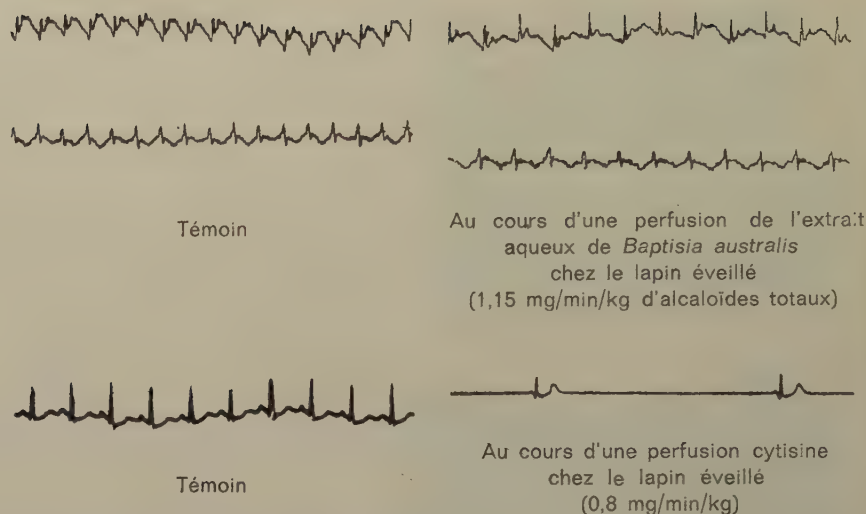


Fig. N° 16

Il semble donc qu'en définitive, seule l'action ganglioplégique de ces deux substances soit à retenir, les actions cardiaques opposées étant masquées l'une par l'autre.

Il est difficile de préciser dans cette action ganglioplégique quelle est la part de la N méthyl cytosine et de l'alcaloïde inconnu P2

**

Ainsi l'activité pharmacologique de la préparation a pu être mise en évidence sur des organes isolés de cobaye (duodénum, oreillette) à des concentrations très faibles (comprises entre 10^{-6} et 10^{-5} g exprimés en alcaloïdes totaux).

In vivo, chez le lapin, les effets tensionnels se manifestent à des doses beaucoup plus élevées (1 mg/kg).

La préparation est douée d'une nette action hypotensive qui ne s'accompagne pas chez le lapin d'une modification du rythme cardiaque, contrairement à ce qu'on observe dans les mêmes conditions expérimentales avec la cytosine seule.

On peut penser que spartéine et cytosine associées dans l'extrait de **Baptisia australis** R. Br, provoquent des effets antagonistes sur le tissu du myocarde, et synergiques sur le tonus vasculaire.

CONCLUSIONS GENERALES

Ce travail est consacré à l'étude d'une Légumineuse Papilionacée, le **Baptisia australis** R. Br..

Dans une première partie, ayant trait à la botanique, nous avons passé en revue tous les caractères du genre **Baptisia** répandu en Amérique du Nord. Le **Baptisia australis** R. Br est originaire d'Amérique boréale ; cette espèce s'acclimate très bien sous nos climats et constitue une belle espèce ornementale avec des fleurs bleues. L'étude anatomique n'a révélé aucun caractère particulier.

Au point de vue chimique, nous avons rappelé les travaux effectués sur différents **Baptisia** et notamment ceux ayant trait à une espèce bien connue des homéopathes, le **Baptisia tinctoria** R. Br d'où ont été extraits la cytisine, la baptisine et la pseudo-baptisine.

Au cours d'essais préliminaires, nous avons mis en évidence dans les feuilles et dans les racines des substances azotées précipitant par les réactifs généraux des alcaloïdes. Ces alcaloïdes sont au nombre de 4 : Cytisine, spartéine, N-méthyl cytisine et un alcaloïde inconnu baptisé par MARION et OUELLET, P2.

La quantité de P2 est tellement petite qu'il ne nous est pas possible de le caractériser convenablement ; néanmoins nous arrivons à donner le spectre d'absorption de ce produit dans l'ultra-violet qui présente 3 maximums à 209 m μ , 228 m μ , 277 m μ et 2 minimums à 217 m μ et 264 m μ . Le taux d'alcaloïdes totaux dans la racine est de 0,346 %.

A côté de ces alcaloïdes, nous avons décelé dans les feuilles 14 acides aminés libres dont 11 ont été identifiés, et dans les racines 16 dont 13 sont connus.

Dans les feuilles, on trouve environ 0,16 % de flavonoïdes totaux. Ils sont au nombre de 2, mais un des 2 disparaît au cours de la purification. Le flavonoïde isolé est insoluble dans l'éther de pétrole, le chloroforme, l'éther, très peu soluble à froid dans l'acétate

d'éthyle, l'acétone et l'eau ; il est très soluble à chaud dans les alcools éthylique et méthylique, et dans l'eau chaude. Son point de fusion est de 240° C (microscope à platine chauffante).

Le spectre ultra-violet en solution éthanolique présente 2 maximums à 257 m μ et 354 m μ avec un épaulement à 264 m μ . Le spectre infra-rouge du produit solide pastillé dans le bromure de potassium montre des bandes d'absorption à 3,01 μ (hydroxyles : sucre et phényle latéral) 6,06 μ (carbonyle), 6,27 μ et 6,72 μ (phényles) 7,96 μ (groupement éther-oxyde). L'hydrolyse acide libère un sucre (glucose) et un aglycone (lutéoline) ; le glucose se fixe en position 7 de la lutéoline. D'après ces résultats, le flavonoïde isolé est un 7 - β - glucoside de la lutéoline.

Dans les racines, nous avons retiré 2 produits, l'un cristallisant en micro-cristaux et l'autre en « oursins ». Le produit précipitant à l'état de micro-cristaux présente un spectre d'absorption dans l'ultra-violet de type isoflavonique. L'hydrolyse acide libère un sucre (Glucose). Les caractéristiques données sont en faveur de l'analogie avec un hétéroside d'isoflavone déjà reconnu dans les racines de **Baptisia tinctoria** R. Br, la pseudo-baptisine, mais 2 points sont toutefois à mentionner : l'éthylate de sodium provoque sur le spectre ultra-violet un déplacement hypsochrome de la bande principale de - 12 m μ alors que la structure proposée n'a pas d'hydroxyle phénolique libre ; l'hydrolyse acide ne donne que le glucose alors que la pseudo-baptisine contient aussi du rhamnose.

Le produit cristallisant en « oursins » présente un spectre ultra-violet absolument semblable à des isoflavones complexes, la ptérocarpine et la trifolirhizine. La faible quantité du produit ne nous a pas permis de pousser plus avant son étude.

Au point de vue des essais pharmacologiques, nous avons effectué la toxicité aiguë chez la souris, des essais in vitro sur des organes isolés de cobaye (duodénum, oreillette) et des essais in vivo chez le lapin. L'extrait aqueux de la teinture de **Baptisia australis** R. Br est doué d'une nette action hypotensive qui ne s'accompagne pas chez le lapin d'une modification du rythme cardiaque, contrairement à ce qu'on observe, dans les mêmes conditions expérimentales, avec la cytisine seule.

On peut penser que spartéine et cytisine associées dans l'extrait de **Baptisia australis** R. Br, provoquent des effets antagonistes sur le tissu du myocarde et synergiques sur le tonus vasculaire.

CONCLUSIONS

1°) Le **Baptisia australis** R. Br plante originaire de l'Amérique du Nord, peut se cultiver sous nos climats, et les conditions sont telles que sa composition chimique serait sensiblement identique d'après les travaux bibliographiques que nous avons consultés.

2°) La composition en substances azotées, montre que dans les racines, il a été identifié : spartéine, cytosine, N-méthyl-cytosine et un alcaloïde dénommé P2 ressemblant à l'anagyrene.

Le % des alcaloïdes totaux dans le matériel analysé est de : 0,346 % de racines sèches.

Les amino acides sont au nombre de 18 dont 14 ont été identifiés. L'alanine, acide glutamique, l'asparagine, la proline et l'arginine sont particulièrement abondants. Cette liste se retrouvera dans les mêmes proportions pour les feuilles.

3°) Le bloc des substances polyphénoliques des feuilles nous a permis d'identifier le 7 - β - glucoside de la lutéoline. La comparaison des spectres U.V. et I.R. avec des produits de référence, donne une certitude et permet d'ajouter le **Baptisia australis** R. Br à la liste des rares plantes ayant ce produit.

Il a été trouvé également un produit ayant la caractéristique des isoflavones sous la forme d'un glucoside et un produit de type isoflavonique (ptérocarpine, trifolirhizine).

4°) L'essai pharmacodynamique d'une teinture de **Baptisia australis** R.Br expérimentée in vivo sur lapin et in vitro sur cobaye (duodenum et oreillette) démontre une activité hypotensive sans modification du rythme cardiaque. La DL se situe à 14 mg / kg chez la souris.

Vu, le Doyen
J.-F. CIER

Le Président de la thèse
G. NETIEN

Vu et permis d'imprimer
Lyon, le 8 Juin 1965

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université
P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — ARCHER (R), FROMAGEOT (Cl.), JUTISZ (M). — *Séparation chromatographique des acides aminés et des peptides*. 5. - Les acides aminés individuels de l'insuline avec une note sur le dosage de la proline. — *Bioch. Biophys. Acta* 50, 81-88.
- 2 — AKISANYA (A), BEVAN (C.W.L.) et HIRST (J). — *West African Timbers. Part II. Heartwood Constituents of the Genus Pterocarpus*. — *J. chem. Soc.* 1959, 2679.
- 3 — BAILLON (H). — *Séries des Podalyres*. — *Histoire des plantes* Librairie Hachette 1870, **2**, 228.
- 4 — BAKER (W), ROBINSON (R), SIMPSON (N.M.) — *Synthetical Experiments in the isoflavone Group. Part VIII ; Notes on pseudo-baptiginin*. — *J. Chem. Soc.* 1937, 805.
- 5 — BAKER (W), CHADDERTON (J), HARBORNE (J.B.), OLLIS (W.D.) — *A new synthesis of isoflavones*. — *J. Chem. Soc.* 1953, 1852.
- 6 — BILLARD (G). — *Pouvoir « anagotique » du sulfate de spartéine sur le venin des Vipères d'Auvergne*. — *C. R. Soc. Biol.* 1926, **94**, 650-52.
- 7 — BOYER (P). — *Action de l'adrénaline et de la spartéine sur le cœur de l'escargot*. — *C. R. Soc. Biol.* 1926, **95**, 1244-47.
- 8 — BREHM (B.G.) — *The distribution of alkaloids, free amino-acides, flavonoids and certain other phenolic compounds in B. leucophea Nutt, var leavicaulis Gray, and their Taxonomic implications*. — Thesis of the University of Texas, 1962.
- 9 — CIER (A), MALLIE (JP). — *Effet cardiovasculaire de la perfusion intraveineuse de la cytisine chez le lapin éveillé*. — *C.R. Soc. Biol.* (réunion du 21-6-65) à paraître.
- 10 — CORNILLEAU (Mlle). — *De la caractérisation et du dosage des dérivés flavoniques*. — Thèse doctorat Univ (Pharm.) Paris 1954.
- 11 — DE CANDOLLE. — *Les Légumineuses*. — *Prodromus systematis naturalis*, éditeur, Fortin-Masson, 1843, **2**, 93.
- 12 — DODEL (P). — *Hémolyse in vitro par le sulfate de spartéine*. — *C. R. Soc. Biol.* 1928, **99**, 578-79.

- 13 — DUBREUIL (A), MONIEZ (R), FRIGOT (P), GORIS (A). — *Contribution à l'étude de la Gaude. Reseda luteola. Isolement d'un nouvel hétéroside de lutéolol.* — Annales Pharm. France. 1961, **19**, 655.
- 14 — ECALLE (H), DELPECH (L), PLEUVRIER (A.) — *Pharmacopée Homéopathique Française*, librairie Baillière, 1898, 1 vol, 400 p.
- 15 — FRANÇOIS (M), SEGUIN (Mlle L.) — *Sur la préparation d'un iodo-bismutate de quinine amorphe et sur son analyse.* — J. Pharm. Chim. 1925, **2**, 59-69.
- 16 — GEISSMAN (T.A.), HARBONE (J.B.), SEIKEL (M.K). — *Anthochlor Pigments. XI. The constituents of Coreopsis maritima. Reinvestigation of Coreopsis gigantea.* — J. amer. Chem. Soc. 1956, **78**, 825.
- 17 — GLEASON (H.A.) — *Baptisia Vent.* — Illustrated Flora of the North-eastern united states and adjacent Canada. 1963, Vol. 2, 391.
- 19 — GORIS (A). — *Localisation des alcaloïdes dans Baptisia australis R. Br.* — Localisation et rôle des alcaloïdes et des glucosides chez les végétaux, Editeur J. LECHEVALIER 1914, **115**, 448 p.
- 20 — HAAG, BERRURIER. — *Recherches phytochimiques sur la Piloselle Hiéracium Pilosella L.* — Thèse doctorat d'état, Strasbourg, 1964, 111 p.
- 21 — HAZARD (R), VAILLE (C). — *Action de la spartéine et de l'adrénaline sur l'intestin isolé du rat.* — C. R. Soc. Biol. 1942, **136**, 636-37.
- 22 — HATTORI (S), MATSUDA (H) — *Glucolutéolin Isolated from the leaves of Sophora angustifolia.* — J. amer. Chme. Sc. 1954, **76**, 5792.
- 23 — HEATHCOTE (R.S. A.) — *The pharmacological of spartéine and some related alkaloids.* — J. pharm. exper Therapeut. 1926, **27**, 431-448.
- 24 — HORHAMMER (L), WAGNER (H) — *Recent developpement in the chemistry of Natural Phénolic Gompounds.* — Pergamon Presse edit. 1961, **10**, 185-193.
- 25 — ING (H.R.) — *The Alkaloids of Ahygyirs foetida.* — J. Chem. Soc. 1935. 1053.
- 26 — JUORD (L). — *Spectra of isoflavones.* — The chemistry of flavonoid compounds, Pergamon Presse 1962, 148.
- 27 — JURD (L). — *Spectra of aluminium complexes ; localisation of 5 and 3 hydroyl groups.* — The Chemistry of Flavonoid Compounds, Pergamon Presse 1962, 119.
- 28 — JURD (L). — *Spectra in alcoholic sodium acétate. Localisation of a 7 hydroxyl groups.* — The Chemistry of Flavonoïds Compounds, Pergamon Press, 1962, 122.
- 29 — JURD (L). — *Effect of méthylation or glucosidation on spectra.* — The Chemistry of Flavonoïd Compounds Pergamon Presse, 1962, 115.
- 30 — JURD (L) — *Detection of 3 and 4' dihydroxyl grouping in flavonols.* — The Chemistry of Flavonoïd Compounds, Pergamon presse, 1962, 126.
- 31 — JURD (L). — *Detection of O-dihydroxyl groups* — The Chemistry of Flavonoids Compounds, Pergamon Press, 1962, 127.

- 32 — KING (F.E.), OTTERILL (C.), GODSON (D.H.), JURD (L) and KING (T.J.). — *The chemistry of Extractives from hardwoods. Part XIII. Colourless constituents of Pterocarpus Species.* — J. Chem. Soc. 1953, 3693.
- 33 — KLEIN (G), FARKASS (E). — *Der microchemische Nachweis der Alkaloid in der pflanze.* — Oesterre. Botan. Z. 1930, **79**, 107.
- 34 — KUPCHAN (S.M.), DAHLE (N.A.) — *Présence de d-spartéine dans Baptisia leucantha T et G.* — J. pharm. Sciences, 1961 **50**, 627.
- 35 — LATHOUD (J.A.) — *Baptisia tinctoria R. Br.* — Etude de Matière médicale et Homéopathique, Editeur MARTIN et TERNET, 1932, **1**, 221-27.
- 36 — LEBRETON (Ph.), CHOPIN (J). — *Contribution à l'étude spectrographique infrarouge des composés flavoniques.* — Spectrochimica Acta, 1963, vol 19, 2099-2112.
- 37 — MAHAL (H.S.), RAI (H.S.), VENKATARAMAN (K) — *Synthetical experiments in the chromone group. Part XII. Synthesis of 7-hydroxyiso-flavone and of α and β naphthoiso-flavone.* J. Chem. Soc. 1934, 1120, 1769.
- 38 — MARION (L), OUELLET (J). — *The Papilionaceous Alkaloids. II Baptisia australis R. Br.* — J. of the Amer Chemical Soc; 1948, 691.
- 39 — MERCIER (F), MACARY (S). — *Spartéine et Modificateurs du parasymphatique : effets combinés sur l'intestin isolé du chien.* — C.R. Soc. Biol., 1942, **136**, 621-623.
- 40 — MERCIER (L.J.), CHERBUBICZ (A). — *Action de la spartéine sur le ventricule, le faisceau auriculo-ventriculaire, les muscles lents et rapides.* — C.R. Soc. Biol., 1926, **94**, 730-32.
- 41 — MERCIER (F), DELPHAUT (J), RIZZO (C). — *Spartéine et réflexes vasomoteurs du sinus carotidien.* — C.R. Soc. Biol., 1934, **115**, 544-46.
- 42 — MERCIER (F), MERCIER (L.J.) — *Action de la spartéine sur l'appareil cardiovasculaire du chien.* — C. R. Soc. Biol. 1925, **93**, 338-40.
- 43 — MILLER et TAINTER. — *Estimation of the E.D. 50 and its error by means of logarithmic . - Probit graph. paper.* — Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1944, **57**, 261-264.
- 44 — MUNIER (R) — *Séparation des alcaloïdes de leurs N-oxydes par chromatographie sur papier.* — Bull. Soc. Chim. Biol. 1953, **35**, 1225.
- 45 — NAKAMURA (H), OHTA (T), HUKUTTI (G). — *On the flavoglucoside of Digitalis purpurea L.* — J. pharm. Soc. Jap, 1936, **56**, 107-108.
- 46 — PARIS (R). — *Sur l'apprésence d'un glucoside de la lutéoline chez la Gaude. Reseda Luteola L.* — Annales phar. franc. 1955, **13**, 485.
- 47 — PARIS (R), STAMBOULI (A). — *Sur les flavonoïdes de quelques Dorycnium indigènes.* — Annales pharm. franc., 1960 **18**, 24.
- 48 — REUTER (L). — *Baptisia tinctoria R. Br.* — Traité de matière médicale et de chimie végétale, édition J.B. BAILLIERE et Fils, 1923, 698-99.

- 49 — SCHINDLER (H). — *Baptisia tinctoria* R.Br. — Inhaltsstoffe und Prüfungsmethoden Hööopathisch verwendeter Heilpflanzen, Editio Cantor, 1955, 32-33.
- 50 — SCOTT (C.C.) CHEN (KK). — *The pharmacological action of N-méthylcytisine*. — J. Pharm. Exp. Ther. 1943, **79**, 334.
- 51 — SHIBATA (K), NAGAI (I), KISHIDA (M). — *The occurrence and physiological significance of flavone derivatives in Plants*. — J. Biol. Chem. 1916, **28**, 93-108.
- 52 — SCHLITTER (E), HOHL (J). — *Über die Alkaloid aus Strychos melinoniana Baillon*. — Helv. Chim. Acta, 1952, **35**, 29.
- 53 — SON. BRENDENBERG (J.B.), HIETALA (P.K.) — *Investigation of the structure of Trifolirhizine, an Antifungal Compound from Trifolium pratense L.* — Acta Chemica Scandinava 1961, **15**, 696-98.
- 54 — SPACH (E). — *Tribu des Sophorées*. — Histoire naturelle des végétaux, Librairie de RORET, 1834, **1**, 152.
- 55 — STAHL (E). — *Dünnschicht chromatographie*. — Arch. Pharmazie 1959, **292**, 411-16.
- 56 — SPATH (E), SCHMIDT (O). — *Die Konstitution der Pseudo-Baptisins*. — Monatsch. Chem. 1929, **53-54**, 454.
- 57 — SPECTOR (W.S.) — *Handbook of Toxicology*, W.B. SAWNDERS. Company Philad. London, 1956, Vol. **1**, 408 p.
- 58 — TEOULE (R), CHOPIN (J), MENTZER (C) — *Synthèse de β - 7 glucoside de la lutéoline*. — Bulle. Soc. Chim. 1960, 2116.
- 59 — VANNIER (P) — *Baptisia tinctoria* R.Br. — Encyclopédie Médico-chirurgicale, Homéopathie, Editeur Masson, 1960, **1**, 38.460 A-10.
- 60 — WALDI (D), SCHNACKERZ (K), MÜNTER (F). — *Eine systematische analyse von Alkaloiden auf Dünnschichtplatten*. — J. of Chrom, 1961, **6**, 61.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	17
Première Partie : ETUDE BOTANIQUE	21
Travaux antérieurs :	
Chapitre I : Le Genre Baptisia	21
Chapitre II : Les différentes espèces de Baptisia et leur description	23
Travaux personnels :	
Chapitre I : Etude morphologique	31
Chapitre II : Etude anatomique	35
Deuxième Partie : ETUDE CHIMIQUE	39
Travaux antérieurs	39
Travaux personnels	41
Chapitre I : Essais préliminaires	41
Chapitre II : Substances azotées	55
I. - Etude des alcaloïdes	55
II. - Les acides aminés	67
Chapitre III : Les substances polyphénoliques	74
Troisième Partie : ETUDE PHARMACOLOGIQUE	91
Travaux antérieurs	91
Travaux personnels	93
CONCLUSIONS GENERALES	99
BIBLIOGRAPHIE	103

